



**EKMEKLİK BUĞDAYLARDA MİKOTOKSİNLERİN (AFLATOKSİN-
OKRATOKSİN A -ZEARALENON) MİKTARLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet Ali EL

Danışman
Prof. Dr. Harun DIRAMAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
Ocak 2023

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKMEKLİK BUĞDAYLARDA MİKOTOKSİNLERİN
(AFLATOKSİN - OKRATOKSİN A -ZEARALENON)
MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Mehmet Ali EL

Danışman

Prof. Dr. Harun DIRAMAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Ocak 2023

TEZ ONAY SAYFASI

Mehmet Ali EL tarafından hazırlanan “Ekmeklik Buğdaylarda Mikotoksinlerin (Aflatoksin B1 ve Toplam Aflatoksin - Okratoksin A -Zearalenon) Miktarları, Rutubet ve Su Aktivitesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 11 / 01 / 2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Harun DIRAMAN

Başkan : Prof. Dr. Harun DIRAMAN
Afyon Kocatepe Üni. Mühendislik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Gökhan AKARCA
Afyon Kocatepe Üni. Mühendislik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Şükrü DEMİRCİ
Namık Kemal Üni. Ziraat Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. İbrahim EROL

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

11 / 01 / 2023

Mehmet Ali EL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EKMEKLİK BUĞDAYLARDA MİKOTOKSİNLERİN (AFLATOKSİN-OKRATOKSİN A -ZEARALENON) MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Mehmet Ali EL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Harun DIRAMAN

Bu araştırmada, Afyonkarahisar ilinde farklı işletmelerden 2021-2022 yılları arasında temin edilen 20 ekmeçlik buğdayda rutubet miktarı gravimetrik olarak ve su aktivitesi Aqlab 4TE cihazı ile Toplam Aflatoksin, Aflatoksin B1, Okratoksin A, Zearalenon varlığı ise resmi onaylı bir Yüksek Basınç Likit Kromatografi yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda 10 ekmeçlik buğday numunesinde tespit edilen AFB1 ve Toplam Aflatoksin düzeyleri sırasıyla 0,031-2,55 ppb ve 0,031-3,01 ppb arasında değişmiş ve sadece 1 numunede tespit edilen AFB1 miktarı (2,55 ppb) ise Türk Gıda Kodeksi (T.G.K.) üst limitlerinin üzerinde bulunmuştur. Yedi numunede Okratoksin A varlığı tespit edilmiş ve düzeyleri 0,17-5,9 ppb arasında değişmiştir. Bir örnekte tespit edilen Okratoksin A miktarı (5,9 ppb) ise T.G.K. üst limitlerinin üzerinde bulunmuştur. Sekiz numunede Zearalenon varlığı tespit edilen ve düzeyleri 2,07-193 ppb arasında değişmiştir. Bir örnekte tespit edilen Zearalenon miktarı (193 ppb) T.G.K. üst limitlerinin üzerinde bulunmuştur. İncelenen tüm parametreler göz önüne alındığında sadece 3 örnekte hiçbir mikotoksin tespit edilmemiştir. Buğdayların rutubet miktarı ortalama %11,09 (%10,65-15,23) olarak bulunmuş ve bir örnekte belirlenen rutubet oranı (%15,23) T.G.K. üst limitlerinin üzerinde bulunmuştur. Su aktivitesi ise ortalama 0,685 (0,675-0,696) olarak tespit edilmiştir.

2023, vii + 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ekmeçlik Buğday, Mikotoksin, Halk Sağlığı, Su Aktivitesi, Nem Düzeyi

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF MYCOTOXINS (AFLATOXIN-OCRATOXIN A-ZEARALENON) IN BREAD WHEAT

Mehmet Ali EL

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Harun DIRAMAN

In this study, the presence of total aflatoxin, aflatoxin B1, Ochratoxin A, Zearalenone, moisture content, and water activity were determined in 20 bread wheat supplied from different businesses offered for sale in Afyonkarahisar between 2021-2022. As a result of the study, the levels of AFB1 and total aflatoxin detected in 10 samples changed between 0.031-2.55 ppb and 0.031-3.01 ppb, respectively, and the amount of AFB1 detected in only 1 sample (2.55 ppb) is in the upper part of the Turkish Food Codex (T.G.K.) found above the limits. Ochratoxin A presence was detected in seven samples and their levels varied between 0.17-5.9 ppb. The amount of Ochratoxin A (5.9 ppb) detected in a sample was found above the upper limits of the T.G.K.. Zearalenone was detected in eight samples and its levels varied between 2.07-193 ppb. The amount of Zearalenone (193 ppb) detected in a sample was found above the upper limits of the T.G.K. Considering all the parameters examined, no mycotoxins were detected in only 3 samples. The moisture content of the wheat was found to be 11,087% (10,65-15,23 %) on average, and the humidity rate (15,23%) determined in one sample was above the upper limits of the T.G.K. The water activity was found to be 0.685 (0.675-0.696) on average.

2023, vii + 53 pages

Keywords: Bread Wheat, Mycotoxin, Public Health, Water Activity, Moisture Level

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Harun DIRAMAN'a, analizlerin gerçekleştirilmesi ve sürecin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Afyonkarahisar Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü İdari ve Teknik Personellerine, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetik Bölümü Toplu Beslenme Sistemleri Ana Bilim Dalı Arş. Gör. Sümeyra SEVİM, Arş. Gör. Arife MACİT ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca manevi desteklerinden dolayı çocuklarım Ali Arda EL, Fatma Zehra EL, Mustafa Mert EL, Zümra Nur EL' e teşekkür ederim.

Mehmet Ali EL
Afyonkarahisar 2023

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1 Mikotoksinler.....	5
2.1.1 Aflatoksin.....	9
2.1.2 Okratoksin A	13
2.1.3 Zearalenon.....	17
2.2 Tahıllarda Rutubet ve Su Aktivitesi.....	19
3. MATERYAL ve METOT	21
3.1 Materyal	21
3.2 Metot.....	21
3.2.1 Toplam Aflatoksin ve Aflatoksin B1 Tespiti	21
3.2.1.1 Aflatoksin HPLC Analizi	22
3.2.2 Okratoksin A Tespiti	23
3.2.2.1 Okratoksin A HPLC Analizi	23
3.2.3 Zearalenon Tespiti.....	24
3.2.3.1 Zearalenon HPLC Analizi	24
3.2.4 Rutubet Miktarı Tayini.....	25
3.2.5 Su Aktivitesi Tayini	25
3.2.6 İstatistiksel Analizler.....	25
4. BULGULAR	26
4.1 Ekmeklik Buğdaylarda Mikotoksin Analizi	26
4.2 Ekmeklik Buğdayların Rutubet Miktarı ve Su Aktivitesi.....	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
5.1 Tartışma	33
5.1.1 Ekmeklik Buğdaylarda Aflatoksin Analizinin Değerlendirilmesi	34

5.1.2 Ekmeklik Buğdaylarda Ochratoxin A Analizinin Değerlendirilmesi	36
5.1.3 Ekmeklik Buğdaylarda Zearalenon Analizinin Değerlendirilmesi	38
5.1.4 Ekmeklik Buğdayların Rutubet Miktarı ve Su Aktivitesinin Değerlendirilmesi	40
5.2 Sonuç	41
6. KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	53



SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

a_w	Su aktivitesi
CO ₂	Karbondioksit
g	Gram
kg	Kilogram
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
pH	Power of Hydrogen
ppb	Milyarda bir
ppm	Milyonda bir
ppt	Binde bir
sn	Saniye
v	Hacim
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
°C	Derece santigrat
%	Yüzde

Kısaltmalar

AF	Aflatoksin
AFB1	Aflatoksin B1
BEN	Balkan Endemik Nefropatisi
EC	European Commission
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
IAK	İmmunoaffinity kolonu
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
OTA	Okratoksin A
RASFF	Gıda ve Yem için Hızlı Uyarı Sistemi
PMTDI	Maksimum tolere edilebilir günlük alım
PMTWI	Maksimum tolere edilebilir haftalık alım
T.G.K.	Türk Gıda Kodeksi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZEA	Zearalenone

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Aflatoksinin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.2 OTA'nın kimyasal yapısı	13
Şekil 2.3 ZON'un kimyasal yapısı	17
Şekil 3.1 Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 standartlarının HPLC kromatogramı	22
Şekil 3.2 Okratoksin standardının HPLC kromatogramı	23
Şekil 3.3 Zearalenon standardının HPLC kromatogramı	24
Şekil 4.1 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait AFB1 içeriği	28
Şekil 4.2 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait Toplam Aflatoksin içeriği	28
Şekil 4.3 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneğine ait Aflatoksin HPLC kromatogramı (5 no'lu örnek)	29
Şekil 4.4 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait Okratoksin A içeriği.....	29
Şekil 4.5 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneğine ait Okratoksin HPLC kromatogramı (3 no'lu örnek).....	30
Şekil 4.6 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait Zearalenon içeriği.....	30
Şekil 4.7 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneğine ait Zearalenon HPLC kromatogramı (5 no'lu Örnek).....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1	Temel tahıl ve tohumlarda oluşan mikotoksinler, küf kaynakları ve etkileri	2
Çizelge 2.1	Avrupa Komisyonu'nda bildirilen bazı mikotoksinlerin tahıllarda maksimum limitleri (E.C., 2006).....	7
Çizelge 2.2	T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Aflatoksin düzeyi.....	11
Çizelge 2.3	T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Okratoksin A düzeyi	14
Çizelge 2.4	T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Zearalenon düzeyi....	18
Çizelge 2.5	Bazı küf cinsleri tarafından mikotoksin oluşumu ve gelişimi için gerekli minimum ve optimum su aktivitesi	20
Çizelge 4.1	Ekmeklik Buğdaylarda mikotoksin analizlerinin geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.....	26
Çizelge 4.2	Afyonkarahisar yöresinde farklı işletmelerden sağlanmış olan ekmeklik buğday örneklerinde tespit edilen Aflatoksin, Okratoksin A ve Zearalenon miktarları.....	27
Çizelge 4.3	Ekmeklik buğdaylarda tespit edilen rutubet miktarları ve su aktivitesi.....	32

1. GİRİŞ

Mikotoksinler, başta *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerinden olmak üzere, küfler tarafından üretilen, gıdaları kontamine edebilen ve insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere neden olabilen ikincil metabolitlerdir. Bugüne kadar tanımlanan mikotoksinlerin sayısı 400'den fazla kategoriye ulaşmaktadır (Reddy vd. 2010). Özellikle mısır, tahıl, soya fasulyesi, sorgum, yer fıstığı gibi gıdalardaki mikotoksin kontaminasyonu, küflerin varlığına, tarımsal uygulamalara ve hasat ve depolama koşullarına bağlı bulunmaktadır (Bennett ve Inamdar 2015). Mikotoksinlerin gıdalarda bulunması, insanlarda ve hayvanlarda akut zehirlenmelerden kronik maruziyetin kanserojen, mutajenik, teratojenik etkiler gibi sonuçlarına kadar farklı düzeylerde zararlı etkilere neden olabilmektedir. Ayrıca mikotoksinlerin gıda işleme ve pişirme gibi termal süreçlerden etkilenmemesi de bu durumun ciddiyetini artırmaktadır (Do vd. 2020).

Mevcut durum, gıda zincirindeki iyi tarım ve üretim uygulamalarının birçok gelişimine rağmen mikotoksin oluşumunun dünya çapında artan bir sorun olduğunu açıkça göstermektedir. Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı ile ekonomik kayıplar üzerindeki etkisi de gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Eskola vd. 2020). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO 2016) tahminlerine göre özellikle gelişmekte olan ülkelerde, mikotoksin problemi 500 milyon insanın mikotoksine maruz kaldığı ve özellikle de 5 yaş altı 160 milyon çocuğun bu toksin maruziyeti nedeniyle bodurluk sorunuyla karşı karşıya kaldığı belirtilmektedir (Møller vd. 2021).

Aflatoksinlerin keşfi 1960' larda birleşik krallıkta hindilerin ölümüyle yapılan araştırmada hindi yeminde bulunan yer fıstığı ununda *A. Flavus* mantarının ürettiği aflatoksin tespit edilmesine dayanmaktadır. Düşük sıcaklıklarda üretilen tarımsal ürünlerin 28 – 32 °C gibi kısmen daha yüksek sıcaklıklarda üretilen tarımsal ürünlere göre Aflatoksinlerle kontaminasyonu riski daha düşüktür. Tarımsal ürünlerin kontaminasyonu riskini artıran unsurlar arasında kemirgenler, böcekler, havanın nem ve sıcaklığı da başlıca rol oynamaktadır. Okratoksin A'nın hasat öncesi kontaminasyonu ile ilgili fazla bilgi bulunmamaktadır. Tarımsal ürünlerde Okratoksin A ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Zearalenon üremesi için oksijen doygunluğuna ihtiyaç vardır. Ayrıca depolama, öğütme, işleme ve tüketime hazır hale getirilmesi sırasında bile stabilitesini koruyabilmektedir (Toxins in food).

Mikotoksinlerin toksisitesi, türüne bağlı olarak değişmektedir. Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı'na (IARC) göre kanserojen tehlike açısından Aflatoksin B1 grup 1 (insanlar için kanserojen), Okratoksin A ise grup 2B yani insan için kanserojen olma olasılığı bulunan olarak sınıflandırılmıştır (Anttila vd. 2002; WHO 1993). AFB1 hepatotoksik, mutajenik, immünoşüpresif ve kanserojen bir bileşik olup esas olarak *Aspergillus* spp. tarafından üretilen ve en yaygın görülen Aflatoksin türüdür. Okratoksin A (OTA), *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen bir başka mikotoksindir. OTA'ya kronik maruziyet, insanlarda immünotoksik ve sitotoksik etkileri ile ilişkilendirilmektedir (Al Anati ve Petzinger 2006; Fink Gremmels vd. 1995). Temel tahıl ve tohumlarda oluşan mikotoksinler, küf kaynakları ve etkileri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Adeyeye 2016).

Çizelge 1.1 Temel tahıl ve tohumlarda oluşan mikotoksinler, küf kaynakları ve etkileri.

Mikotoksin	Ham madde	Küf kaynağı	Etkileri
Aflatoksin B1, B2	Mısır, fıstık ve diğer bir çok ürün	<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksin B1 ve doğal olarak oluşan Aflatoksin karışımları, IARC tarafından potansiyel insan kanserojenleri olarak tanımlanmıştır. Çeşitli hayvanlarda, özellikle tavuklarda yan etkiler gösterir.
Aflatoksin B1, B2, G1, G2	Mısır, fıstık	<i>Aspergillus parasiticus</i>	
OTA	Arpa, buğday ve diğer bir çok ürün	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	IARC tarafından muhtemel insan kanserojeni olarak tanımlanmıştır. Laboratuvar hayvanları ve domuzlarda kanserojendir.
ZON	Mısır, buğday	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i>	Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından olası bir insan kanserojeni olarak tanımlanmıştır. Dişi domuzlarda üreme sistemini etkiler.

Ortak FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA), OTA'nın koşullu maksimum tolere edilebilir haftalık alımını (PMTWI) 0.1 µg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (Joint ve Additives, 2001). Zearalenone (ZEA), *Fusarium* türleri tarafından üretilen bir başka mikotoksindir. ZEA'nın üreme işlevini etkileyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Minervini ve Dell'Aquila, 2008). JECFA, ZEA için koşullu maksimum tolere edilebilir günlük alım (PMTDI) değerini günde 0,5 µg/kg olarak belirlemiştir (JECFA 2000, 2007).

Tahıllar dünyada olduğu gibi ülkemizde de yüzyıllardır yetiştirilmekte olup insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle buğday, arpa, çavdar, yulaf, darı, pirinç ve mısır Türkiye'de yetiştirilen temel tahıl türleridir. Bunlar içerisinde buğday tarım üretim alanlarının yaklaşık %20'sini kapsayarak en fazla üretimi yapılan tahıl olmuştur (Özberk vd. 2016). Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre Türkiye'de 2020 yılında buğday üretimi %7,9 artarak 20,5 milyon tona ulaşırken 2021 yılından %13,9 oranında azalarak yaklaşık 17,7 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (TÜİK, 2021). Türkiye'de buğday yurt içi kullanımı yaklaşık 18 milyon ton olup bunun %79'u gıda sektöründe, %13'ü yem sanayisinde, %8'i ise tohumluk olarak tüketilmektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı 2021).

Tahıllar tarladan hasat, taşıma, depolama ve işleme süreçlerinde uygun olmayan koşullar nedeniyle sıklıkla küf ve küflerin ürettiği mikotoksin kontaminasyonu riski taşımaktadır. Özellikle ülkemizde önemli bir yere sahip olan buğdayın bu küf ve mikotoksinlerle kontaminasyonu üzerine dikkat çekilmekte ve halk sağlığı açısından önemli sorunlar teşkil ettiği belirtilmektedir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada 60 farklı ambardan hasat döneminde ve depolanmış buğdaylardan örneklerden alınmış ve yapılan araştırmalar sonucunda toplam 79 farklı mikrofungus tanımlanmıştır. Buğday örneklerinin 52 tanesinde *Alternaria* cinsi, 44 tanesinde *Penicillium* cinsi, 40 tanesinde *Cladosporium* cinsi, 39 tanesinde *Aspergillus* cinsi ve 18 tanesinde *Rhizopus* cinsine ait türler tespit edilmiştir. Buğday örneklerinde en fazla tür çeşitli tespit edilen tür ise 12 tür ile *Penicillium* cinsinde, 9 tür ile de *Aspergillus* cinsinde bulunmuştur. Sonuç olarak araştırmacı buğday örneklerinde 1-18 adet mikrofungus tespit edilirken, sadece 1 örnekte hiç mikrofungus tespit edilmediğini belirtmiştir (Aydoğdu 2016).

Joshaghani ve ark. (2013) da yaptıkları çalışma sonucunda inceledikleri buğdaylarda en yaygın olarak tespit edilen türlerin *Alternaria* spp. (%26.7), *Aspergillus niger* (%21.4), *Fusarium* spp. (%17.8), *Aspergillus flavus* (%10.7), *Cladosporium* spp. (%10.7), *Penicillium* spp. (%8.9) ve *Rhizopus* spp. (%3.5) olduğunu belirtmiştir vd., 2013). Birck ve ark. (2006) ise araştırdıkları buğdayların % 100'ünde *Aspergillus*, %80'inde *Fusarium* ve %60'ında *Penicillium* türlerini tespit etmişlerdir (Birck vd. 2006). Mostofa ve ark. da (2011) *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin buğday yüzeyinde en yaygın bulunan türler olarak belirtmişlerdir (Mostafa vd. 2011).

Yapılan çalışmalar buğdayda oluşan küflerin mikotoksin üretebildiğini belirtmektedir. Ayrıca dünyada yüksek oranda ürünlerin mikotoksin kontaminasyonu ile karşı karşıya olduğu bildirilmiştir (Girgin vd. 2001b). Buğdaylarda küflenmenin, dolayısıyla kalitatif ve kantitatif kayıpların önlenmesi için depolama alanlarının sıcaklık, nem, havalandırma şartlarının uygun olması gerekmektedir. Özellikle buğday tanelerinin nem içeriğinin mikrobiyal gelişim için uygun olan kritik nem düzeylerinin altında olması gerektiği belirtilmektedir (Aydoğdu 2016).

Günümüze kadar 400'den fazla mikotoksin türü belirlenmiş, yapılan çalışmalarda gıda güvenilirliği, sağlık ve ekonomik kayıplara neden olan Aflatoksinler başta olmak üzere Zearalenon, Okratoksin A, *Patulin* ve *Fusarium* türleri önem kazanmıştır. Gıdaların mikotoksin kontaminasyonu tüm dünyada problem teşkil etmektedir. Tarımsal ürünlerin önemli bir kısmı hasat öncesi tarlada, hasat sonrası silo ve depolarda uygun olmayan ısı ve rutubet etkisiyle küflerin istilasına uğrayarak *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türü küflerle kontamine olmaktadır. Uygun şartlarda saklanmayan gıdalarda küfler gelişmekte bu küflerinde ikincil metabolitleri olan mikotoksinler için uygun sıcaklık ve nem koşullarında mikotoksinler ortaya çıkabilmektedir. Bu kontamine gıdaları tüketen insanlarda da kanserojenik sağlık problemlerine neden olmaktadır. Ayrıca bu kontamine gıdaların ihracatında aksamalara neden olarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Buğday kolay depolanabilen, besleyici özelliği ve birçok ürüne işlenmesi nedeniyle insan gıdası olarak en fazla tahıl kullanılmaktadır. Bu çalışmada Afyonkarahisar yöresinde, genel olarak üretilip ticari amaçla kullanımı yapılan ekmeklik buğdaylarda bazı mikotoksinlerin (Aflatoksin, Okratoksin A, Zearalenon) varlığını, rutubet miktarı ve su aktivitesinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, uygun koşullarda depolanmayan gıdalar üzerinde gelişen küflerin uygun nem ve sıcaklık koşullarında gıdalarda ürettiği ikincil zehirli metabolik bileşiklerdir. Mikotoksin terimi Yunancada mantar anlamına gelen ‘mykes’ ile Latince zehir anlamına gelen ‘*toxicum*’ kelimelerinin birleştirilmesi ile türetilmiştir (Tayfur 2009). *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi küfler tarafından oluşturulmaktadır. Mikotoksinler zehirli bileşikler olup insan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etkileri bulunmaktadır (Steyn ve Stander 1999).

Mikotoksinlerin gelişimini etkileyen çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyoloji faktörler bulunmaktadır. Fiziksel faktörler; ortamın nemi ve sıcaklığı, ürünün nemi, kurutma hızı ve sıcaklığı, nispi hava nemi, mekanik zararlanma, zaman ve ürünlerin karıştırılması olarak sıralanabilmektedir. Kimyasal faktörler ortamın CO₂ ve O₂ düzeyi, substratın yapısı ve substrata uygulanan kimyasal işlemlerdir. Biyolojik faktörler ise daha çok bitkinin türü, yapısı, kontamine mikroorganizmalar gibi etkenlerdir (Tiryaki vd. 2011).

Mikotoksinlerin gıdalara kontaminasyonu üç temel yolla gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki direk kontaminasyon olarak adlandırılan gıdanın direk gözle görülür şekilde küflenerek mikotoksinin direk kontamine olmasıdır. İkinci yol, gıdanın dolaylı olarak kontamine hammadde ya da katkı maddeleriyle işlem görmesi sırasında gerçekleşen dolaylı kontaminasyondur. Carry over olarak adlandırılan üçüncü yol ise çiftlik hayvanlarının kontamine yemlerle beslenmesi sonrasında vücutlarında toksinlerin metabolize olarak farklı bir forma dönüşmesiyle oluşmasıdır (Tunail 2000).

Mikotoksinler diyetle fazla miktarda bulundukları zaman insanlar ve hayvanlar üzerinde akut veya kronik olumsuz etkiler gösterebilirler. Özellikle karaciğer, böbrek, sinir sistemi, endokrin ve bağışıklık sistemi başta olmak üzere birçok hedef organı veya sistemi etkileyebilmektedirler (Tayfur 2009).

Birçok uluslararası kuruluş, mikotoksinler için düzenleyici limitlerin evrensel standardizasyonunu sağlamak için çalışmalara devam etmektedir. Bu konudaki değerlendirme süreci, özütleme, temizleme ve ayırma tekniklerini içeren çok çeşitli laboratuvar testlerini içermektedir. Resmi düzenlemelerin ve kontrol yöntemlerinin çoğu, uluslararası kuruluşlar aracılığıyla belirlenen yüksek performanslı sıvı tekniklerine (örneğin HPLC) dayanmaktadır. Bu toksinlerle ilgili herhangi bir düzenlemenin, ticaret anlaşması bulunan diğer ülkelerle uyumlu olması gerektiği belirtilmektedir. Mikotoksinler için yöntem performans analizi standartlarının çoğu, Avrupa Standardizasyon Komitesi (the European Committee for Standardization) tarafından belirlenmektedir (Shephard, 2008). Bununla birlikte, bilimsel risk değerlendirmesinin genellikle kültür ve politikadan etkilendiğini ve bunun da mikotoksinlerin ticaret düzenlemelerini etkileyeceğinin unutulmaması gerektiği vurgulanmaktadır (Ashiq 2015).

Gıda bazlı mikotoksinler, 20. yüzyıl boyunca dünya çapında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Avrupa'da, gıda ve hayvan yemlerinde izin verilen çeşitli mikotoksinlerin yasal seviyeleri, birçok Avrupa direktifleri ve Avrupa Komisyonu (European Commission) düzenlemeleri tarafından belirlenmiştir (Adeyeye, 2016). Bu düzenlemelere ait tahıllarda kabul edilen maksimum limitler Çizelge 2'de verilmiştir (E.C., 2006). ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), dünyada tahıl ve tahıl ürünlerinin en az %25-40'ının mikotoksin ile kontamine olarak tüketildiğini belirtmiş ve 1985'ten beri gıda ve yem endüstrilerindeki mikotoksin konsantrasyonlarına ilişkin limitlere yönelik düzenlemeler ve uygulamalar geliştirmiştir. Ayrıca FDA, mikotoksinlerin pratik olarak belirli bir seviyede tutulmasını sağlamak için bu endüstrileri çeşitli uyum programları aracılığıyla izlemektedir (Ashiq 2015, Demirel ve Sariozlu 2014).

Çizelge 2 .1 Avrupa Komisyonu’nda bildirilen bazı mikotoksinlerin tahıllarda maksimum limitleri (E.C. 2006).

Gıda Maddesi	Mikotoksinler	
	Aflatoksin	
	Maksimum limit (µg/kg)	
	B1	B1 + B2 + G1 + G2
Tüm tahıllar ve tahıl bazlı ürünler	2,00	4,00
	Okrotoksin A	
	Maksimum limit (µg/kg)	
İşlenmemiş tahıllar	5	
	Zearalanon	
	Maksimum limit (µg/kg)	
İşlenmemiş tahıllar (mısır hariç)	100	
Doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve tahıl unları	75	
Ekmek, hamur işleri, bisküviler, tahıllı atıştırmalıklar ve kahvaltılık gevrekler	50	
Bebekler ve küçük çocuklar için işlenmiş tahıl bazlı gıdalar ve bebek mamaları	20	

Yapılan bir çalışmada 2009-2018 yılları arasında Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi (RASFF)'ne üye ülkelerde tahıl ve fırıncılık ürünleriyle ilgili bildirilen mikotoksin (AFB1, Toplam Aflatoksin, OTA) düzeyleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda AFB1 için yapılan bildirimlere göre AFB1 düzeyinin ortalama 21,92 µg/kg (min: 2.1 µg/kg, max: 251.0 µg/kg) olduğu, Toplam Aflatoksin düzeyinin ortalama 34.98 µg/kg (min: 2.8 µg/kg, max: 328.0 µg/kg) ve OTA düzeyinin ortalama 23.10 µg/kg (min: 1.0, max: 471.0 µg/kg) olduğu tespit edilmiştir. AFB1 için elde edilen sonuçların Avrupa Komisyonu tarafından bildirilen maksimum limit değerlerinin üzerinde olduğu, Toplam Aflatoksin ve OTA değerlerinin ise yıllara göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Sağlam ve Masatcıoğlu 2021).

Ülkemizde de insan ve hayvan sağlığını koruma altına almak için gıda ve yemlerde bulunabilecek mikotoksinlerin tolere edilebilir en yüksek miktarları yasal düzenlemelerle belirlenmiştir. Buna göre analiz edilecek örneklerin 26/4/2007 tarih ve 26504 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan “Türk Gıda Kodeksi – Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği”nde belirtilen hükümlere uygun olarak hazırlanması ve uluslararası kabul görmüş analiz metotlarının uygulanması gerektiği belirtilmektedir. Ayrıca gıdalarda kabul edilebilir maksimum mikotoksin limitleri 17.05.2008 tarihli resmi gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren 2008/26 tebliğ numaralı “Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ ” ile yayınlanmıştır (Anonim, 2008). En sık karşılaşılan mikotoksinler Aflatoksin, Okratoksin, trikotesenler, zeranol, patulin, siklopiazonik asit ve fumonisin olarak sıralanabilmektedir (Girgin vd. 2001b; Sabuncuoğlu vd. 2008).

2.1.1. Aflatoksin

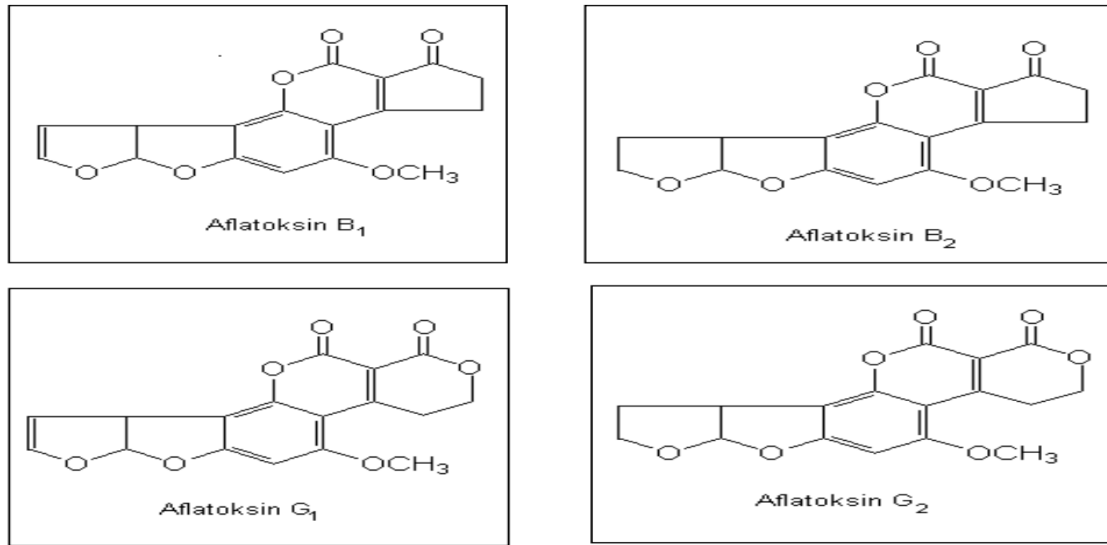
En yaygın olarak bilinen ve insanlar için hepatokarsinojen olan Aflatoksinler, *A. flavus* ve *A. parasiticus* gibi *Aspergillus* mantar türleri tarafından üretilen bir tür mikotoksindir (Adeyeye 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı *A. nomenis* ve *A. tamarii* türlerinin de Aflatoksin ürettiğini göstermiştir. *Aspergillus* türleri çok çeşitli substratlar üzerinde ve çeşitli çevresel koşullar altında üreyebilmektedir. Bu nedenle birçok gıda, üretim, işleme, nakliye ve depolama gibi besin işleme aşamalarında aflatoksijenik mantarlara karşı oldukça hassastır (Negash 2018).

Bunun yanı sıra Aflatoksinler, ürünün tarlada ya da bahçede yetişmesi sırasında da gelişebilmekte ve ürün nemi ve su aktivitesi, ortamın nispi nemi ve sıcaklığı, ürün türü, atmosferik gazlar da Aflatoksin gelişimini etkilemektedir. Özellikle sıcaklık ve nispi nem önemli faktörler arasında gösterilmektedir. Aflatoksijenik küflerin en iyi gelişimi 24-35°C ve %70'in üzerindeki nispi nemlerde gösterdiği belirtilmektedir. Ancak bu küflerin toksin oluşumu için ihtiyaç duyduğu değerlerin farklı olduğu ve küf türüne göre de değişim gösterdiği belirtilmektedir (Yentür ve Er 2011).

İngiltere'de 1960 yılında aflatoksikoz (Turkey "X" hastalığı olarak bilinen) salgını, büyük bir çiftlik hayvanının ölümüne neden olmuş ve *A. flavus* tarafından kontamine olmuş yerfıstığı küspesinde Aflatoksin varlığının tespiti bildirilmiştir. Aflatoksin kontaminasyonu, doğrudan mahsul kaybı, hayvancılık ve süt ürünlerindeki kayıplar ve dolaylı olarak kalite kontrol programlarında, araştırma ve eğitimde tekrar eden harcamalar, daha düşük döviz kazançları ve hassas ürünler için gereken depolama ve paketleme maliyetlerindeki artıştan kaynaklanan birçok ekonomik kayba neden olmaktadır (Negash, 2018). Ülkemizde ise 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen 10 ton iç fındıkta Aflatoksin tespit edildiği gerekçesiyle ürünler geri çevrilmiş ve ilk kez Aflatoksin sorunu ortaya çıkmıştır. İlerleyen yıllarda da Antep fıstığı, kuru incir ve kırmızıbiber ihracatında tespit edilen yüksek miktarlardaki Aflatoksin önemli problemlere yol açmıştır (D'Mello 1997).

Günümüze kadar Aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 en yaygın olmak üzere 18 farklı Aflatoksin türü tanımlanmıştır. Aflatoksin şemsiye terimi, genellikle üretilen dört farklı mikotoksin tipini (B1, B2, G1, G2) ifade etmektedir (Adeyeye, 2016). Bu dört majör Aflatoksin türü ultraviyole ışık altında gösterdikleri renklere göre isimlendirilmişlerdir. Buna göre mavi (Blue) floresans renk verenler AFB1 ve AFB2, yeşil (Green) renk verenler AFG1 ve AFG2 olarak isimlendirilmiştir. AFM1 ve AFM2 ise sütte (Milk) bulunması nedeniyle M ile adlandırılmıştır. Ayrıca bir '1' olarak numaralandırılan tür majör, iki '2' olarak numaralandırılan tür ise minör bileşeni ifade etmektedir (Bbosa vd. 2013). Bu türler içerisinde de AFB1 ve AFG1 en sık görülen türlerdir. En toksik tür olan Aflatoksin B1, güçlü bir kanserojendir ve birçok hayvan türünde karaciğer kanseri gibi olumsuz sağlık etkileriyle doğrudan ilişkili bulunmuştur (Adeyeye 2016).

Aflatoksinin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir (Özkaya ve Temiz, 2003).



Şekil 2.1 Aflatoksinin kimyasal yapısı

Aflatoksinler, bugüne kadar başta Afrika ve Asya ülkeleri olmak üzere dünyanın çeşitli yerlerinde karaciğer kanseri, Reye sendromu, Hint çocukluk çağı sirozu, kronik gastrit, kwashiorkor ve bazı mesleki solunum yolu hastalıkları dahil olmak üzere birçok hastalıkta rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca Çin, Filipinler, Tayland, Kenya, Svaziland ve Mozambik'te, gıda arzındaki yüksek Aflatoksin seviyeleri insanlarda, karaciğer kanseri ile ilişkili olabilecek sınırlarında Aflatoksinler ve türevleri ile ilişkilendirilmiştir (Jelinek vd. 1989).

Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerindeki potensiyel tehlikesi, çeşitli ürünlerde bulunabilecek toksin düzeyleri için dünya çapında izleme programlarının yanı sıra neredeyse tüm ülkeler tarafından düzenleyici eylemlerin oluşturulmasına yol açmıştır. Gıdalarda ve yemlerde izin verilen maksimum Aflatoksin içeriği için farklı ülkelerde sıfır toleranstan 50 ppb'ye kadar değişen seviyeler arasında üst limitler belirlenmiştir (Patterson, 1983). ABD dahil çoğu ülke, gıdalarda 20 ppb civarında bir düzenleyici seviyeye sahipken, 1 Ocak 1999'da Avrupa Ekonomik Topluluđu (the European Economic Community) tarafından gıdalarda Aflatoksin için oldukça düşük limitler (Aflatoksin B1 için 2,0 ppb ve Toplam Aflatoksin için 4,0 ppb) belirlenmiştir (Negash, 2018). Ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi tarafından farklı gıdalar için Aflatoksin üst limitleri belirlenmiştir. Buna göre 2008/26 tebliğ numaralı Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Aflatoksin düzeyi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Anonim 2008).

Çizelge 2.2 T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Aflatoksin düzeyi.

Gıda maddesi	Maksimum limit (µg/kg)	
	B1	B1 + B2 + G1 + G2
Tahıllar (karabuğday [<i>Fagopyrum sp.</i>] dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,00	4,00

İstanbul ilinde yapılan bir çalışmada 112 farklı un örneği (25 tam buğday unu, 29 beyaz un, 30 çavdar unu ve 28 kepekli un) toplanmış ve Aflatoksin düzeyleri LC-MS/MS cihazı ile belirlenmiştir. Çalışma sonunda un örneklerinin 9'unda Aflatoksin düzeyi 0,17-5.95 ±0,002 µg/kg arasında bulunmuş ve sadece bir çavdar unu örneğinde Toplam Aflatoksin B1+B2+G1+G2 düzeyi (5,95 µg/kg) T.G.K.'nin belirlediği üst limit değerin (4 µg/kg) üzerinde saptanmıştır (Türkeşsiz ve Bostan 2020).

Hatay’da yapılan bir çalışmada 29 adet buğday örneğinde AFB1 ve Toplam Aflatoksin düzeyleri HPLC yöntemi ile araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Avrupa Komisyonu ve Türk Gıda Kodeksinin belirlediği üst limitler ve RASFF portalında tespit edilen veriler ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda buğday örneklerinde en yaygın olarak sırasıyla AFB1 (%44,8), AFG1 (%27,6) ve AFB2 (13,8) bulunduğu tespit edilmiş ve AFG2’ye rastlanmamıştır. Çalışmada AFB1 konsantrasyonu ortalama 0.246 µg/kg (min: 0.136 µg/kg - max: 0.484 µg/kg) olarak belirlenmiş ve tespit edilen değerlerin hiçbirisi Avrupa Komisyonu ve T.G.K.’ya göre tahıl ve tahıl ürünlerinde AFB1 maksimum limit değerinin üstünde olmamıştır. Ayrıca RASFF bildirimlerinde tespit edilen düzeylerin oldukça altında kaldığı belirtilmiştir. Dört buğday örneğinde AFB2 (0.090-0.190 µg/kg), 8 buğday örneğinde ise AFG1 (0.216-0.540 µg/kg) tespit edilmiştir (Sağlam ve Masatcıoğlu 2021).

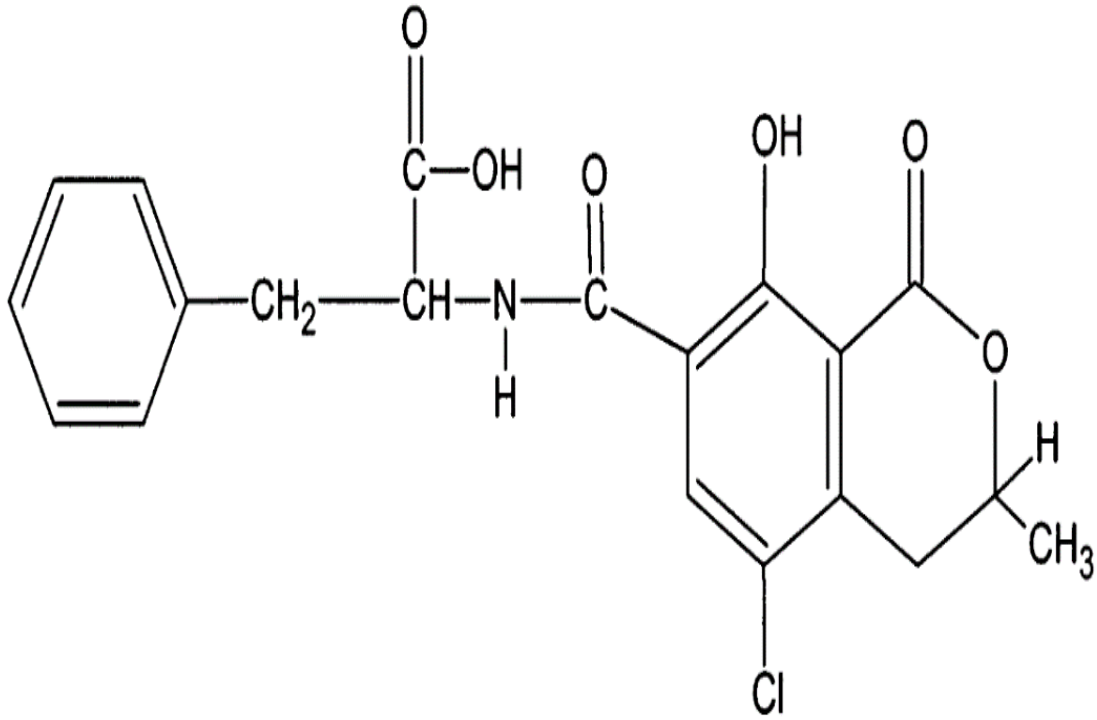
Erzurum’da yapılan bir çalışmada 50 buğday ununda ELISA yöntemi ile Toplam Aflatoksin ve AFB1 varlığı araştırılmış ve 37 örnekte AFB1 düzeyleri tespit edilebilir limitlerin üzerinde, 8 örnekte de T.G.K.’nin belirlediği AFB1 üst limit değerinin üzerinde bulunmuştur. Ayrıca 9 örnekte tespit edilen Toplam Aflatoksin miktarı T.G.K.’ya göre kabul edilebilir limitlerin üzerinde bulunmuştur (Özturan vd. 2007).

Trakya’nın 7 farklı bölgesinden toplanan bir başka çalışmada 100 buğday ununun 45’inde Aflatoksin düzeyleri 0,05-14,01 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu örneklerin de ikisinde belirlen miktarlar T.G.K.’nin belirlediği üst limit değerin (4 µg/kg) üzerinde olmuştur (Anonim 2008).

Bir başka çalışmada Çorum’dan, 25 adet ekmeklik un, 20 adet tam buğday unu, 10 adet çavdar unu ve Tekirdağ’dan alınan 10 adet ekmeklik un, 20 adet tam buğday unu ve 5 adet çavdar unu örneği toplanmış ve ELISA yöntemiyle Aflatoksin düzeyleri incelenmiştir. Çalışma sonunda Çorum’dan alınan tam buğday unu ve ekmeklik unlarda tespit edilen en yüksek Aflatoksin miktarı 0,56 ppb olurken çavdar unlarındaki Aflatoksin düzeyleri tespit limitinin altında kalmıştır. Tekirdağ’dan toplanan örneklerde ise tespit edilen en yüksek Aflatoksin düzeyleri çavdar unlarında 2,10 ppb ve tam buğday unlarında 1,99 ppb olmuş ve de ekmeklik unlarda tespit edilebilir limitin altında kalmıştır (Güher 2008)

2.1.2. Okratoksin A

Okratoksin, A, B ve C olmak üzere üç farklı ikincil metabolit formunda bulunan bir mikotoksindir. Tüm formlar *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tarafından üretilmektedir. Bu üç form, Okratoksin B'nin (OTB), Okratoksin A'nın (OTA) klorlanmamış formu olması ve Okratoksin C'nin (OTC), Okratoksin A'nın bir etil ester formu olması bakımından farklılık göstermektedir. Bu türler içinden özellikle OTA kanserojen ve nefrotoksik olarak belirlenmiştir (Adeyeye 2016). OTA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir (Hussein ve Brasel 2001). İnsanlar üzerindeki en önemli etkisinin Balkan Endemik Nefropatisi (BEN)'ne neden olması olarak gösterilmektedir. BEN, böbreklerde nefropatiye neden olan, yüksek mortaliteli ve kronik bir hastalıktır (Seviktürk ve Gönülalan 2007). Ayrıca insanlarda idrar yolu tümörleri ile ilişkilendirilmiştir (Adeyeye 2016).



Şekil 2.2 OTA'nın kimyasal yapısı

OTA oluşumunda ortam sıcaklığı, ürünün nem miktarı, su aktivitesi ve tipi, diğer mikroflora varlığı, mevcut küfün suşu ve tohum kalitesinin en önemli belirleyiciler olduğu ve en yüksek kontaminasyon riskinin tahıllarda olduğu belirtilmektedir (Büyüker 2018). Kara ve ark. da buğdayın ülkemizde en yaygın olarak OTA ile bulaşmış mahsul olduğunu belirtmektedir. Ayrıca Türkiye'nin iklim şartlarının ochra-toksijenik küf gelişimi için oldukça uygun olduğunu ve bundan dolayı ürünlerin hasat öncesi ve sonrasında OTA ile kontamine olabileceğini bildirmektedir (Kara vd. 2015).

OTA'nın zararlı etkileri göz önüne alınarak birçok kuruluş tarafından kabul edilebilir yasal limitler belirlenmiştir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (The European Food Safety Authority - EFSA), tolere edilebilir düzeyi haftalık olarak 120 ng/kg olarak belirlemiştir. Kodeks Alimentarius ise buğday, arpa ve çavdar için Kabul edilebilir maksimum düzeyi 5 µg/kg olarak belirlemiştir.

Ülkemizde 'de T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum OTA düzeyi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Anonim 2008).

Çizelge 2.3. T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Okratoksin A düzeyi.

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
İşlenmemiş tahıllar	5,00
Tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,00

Yapılan bir çalışmada 39 adet aşurelik buğday, 22 adet mısır, 20 adet mısır unu, 6 adet yulaf ezmesi, 3 adet yulaf unu, 1 adet yulaf gevreği ve 9 adet yulaf muslinde OTA düzeyleri HPLC yöntemi ile incelenmiş ve toplamda dört örnekte (1 adet aşurelik buğday örneği, 2 adet mısır unu örneği ve 1 adet yulaf ezmesi örneği) 0.27-9.84 ppb OTA tespit edilmiştir. Araştırmacı, bu düzeylerin insan sağlığı için herhangi bir risk oluşturmadığını ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir (Karagözlü ve Karapınar 2000).

Erzurum'da 2007 yılında yapılan çalışmada buğday unlarında ayrıca OTA düzeyleri de incelenmiştir. Buna göre incelenen 50 örnekten 45'inde OTA tespit edilmiş, örneklerin 6 tanesinde de OTA düzeyi T.G.K.'nın kabul edilebilir sınırların üzerinde bulunmuştur (Özturan vd. 2007).

Bir başka çalışmada Bursa'da toplanan 34 beyaz un örneği, 10 tane mısır unu örneği, 14 kepekli un örneği ve 28 kepekli undan yapılmış ekmek ve 10 tane mısır unundan yapılmış ekmek örneğinde OTA varlığı incelenmiş ve elde edilen sonuçların endişe verici olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda 110 örnekte OTA tespit edilmiş ve örneklerin %70'inde tespit edilen OTA düzeyinin limit değerlerin (3 ng/g) üzerinde olduğu bildirilmiştir (Cengiz vd. 2007).

Kayseri'de yapılan bir çalışmada 25 adet buğday unu, 25 adet pirinç ve 25 adet bulgur örneği farklı ambarlardan toplanmış ve OTA içeriği ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışma sonunda buğday unu örneklerinde ortalama $390,93 \pm 0,01$ ppt (min:145,66 max:1011,84 ppt) OTA tayin edilmiştir. Araştırmacı elde edilen sonuçların T.G.K.'nın kabul edilebilir sınırlarının altında olmasına rağmen ürün tüketimleriyle gerçekleşebilecek maruziyet düzeylerinin göz ardı edilmemesi gerektiği ve düzenli olarak OTA tayinlerinin yapılmasını gerektiğini vurgulamaktadır (Seviktürk ve Gönülalan 2007).

Demirel ve Sarıözlü (2014) 12 buğday unu örneğinin 11'inde 0,8-3,02 $\mu\text{g/kg}$ arasında OTA tayin etmiş ve sadece 3 örnekte T.G.K. ve Avrupa Komisyonu'nun belirlediği sınırların üzerinde olduğunu belirtmiştir (Demirel ve Sarıozlu 2014). Kara ve ark. (2015)

da 2011-2013 yılları arasında topladıkları 60 buğday ununda HPLC yöntemiyle OTA tayini yapmışlar ve örneklerin %26.7'sinde ortalama 0,105-0,918 µg/kg arasında OTA tayin etmişlerdir (Kara vd. 2015).

Güncel bir çalışmada Mersin'den toplanan buğday örneklerinde HPLC yöntemi ile OTA analizi yapılmış ve örneklerin %15'inde OTA tespit edilmiştir. Tespit edilen düzeyler ölçüm limiti ile 6,93 µg/kg arasında kalırken iki örneğin OTA içeriği T.G.K.'nın kabul edilebilir sınırlarının üzerinde olduğu, 8 örneğin de Avrupa Parlamentosu'nun öngördüğü standartlara uygun olmadığı bulunmuştur. Ancak genel olarak tüketicilerin buğday bazlı ürünlere güvenebileceği belirtilmiştir (Hepsağ 2020).

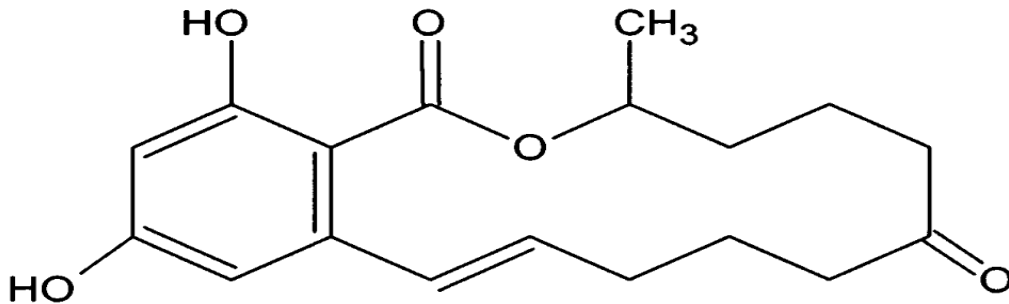
Hatay'da yapılan çalışmada 29 adet buğday örneğinde Aflatoksinin yanı sıra OTA düzeyleri HPLC yöntemi ile araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Avrupa Komisyonu ve T.G.K.'nın belirlediği üst limitler ve RASFF portalında tespit edilen veriler ile karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda 25 örnekte OTA tespiti yapılmış ve en yaygın (%82,8) bulunan mikotoksin olduğu belirtilmiştir. Tespit edilen OTA düzeyi 0,174-137,880 µg/kg arasında değişmekte olup ortalama 17,875 µg/kg olmuştur. Buğday örnekleri içinde 5 numunede tespit edilen düzeyler, Avrupa Komisyonu ve T.G.K.'de belirtilen işlenmemiş tahıllar için maksimum OTA düzeyi (5 µg/kg)'nin üstünde saptanmıştır. Bu örneklerin %10,3'ünün de 2009-2018 yılları arasında gerçekleşen RASFF bildirimlerinde tespit edilen OTA düzeylerinin ortalamasından yüksek olmuştur (Sağlam ve Masatcıoğlu 2021).

Yapılan çeşitli çalışmalarda da ekmek türlerindeki OTA düzeyleri araştırılmıştır ve bazılarında tespit edilen miktarlar maksimum sınırın altındayken bazı çalışmalarda da üstünde bulunmuştur (Koç 2016; Zinedine vd 2007). Ekmekte tespit edilen OTA düzeyinin en büyük etkeni olarak ekmeğin yapıldığı unda bulunan OTA düzeyi olduğu ileri sürülmektedir. Pişirme işlemi sırasında OTA düzeyinin en fazla %20 oranında azaltılabildiği, dolayısıyla tahıl ürünlerinin ve unların OTA kontaminasyonu açısından büyük önem taşıdığı belirtilmektedir (Büyüker 2018).

2.1.3. Zearalenon

Zearalenon (ZON), esas olarak *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* tarafından deoksinivalenol (DON) ile birlikte üretilen östrojenik bir mikotoksindir. Bu bileşik ayrıca *Fusarium kernelis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium semitectum* ve *Fusarium moniliforme* tarafından da sentezlenmektedir. Mısır ve mısır bazlı ürünler ZON kontaminasyonunda öne çıkmış olsa da toksin, sıcak ve ılıman iklimlerde arpa, buğday, yulaf, pirinç ve sorgum gibi diğer tahıllarda da oluşabilmektedir (Authority 2004). Bu toksin hayvanlarda, özellikle vulvar ve meme şişmesi ve doğurganlığın azalması ile karakterize edilen domuzlarda hiperöstrojenizm ile ilişkilendirilmiştir. Toksisitesi nedeniyle, 2011'de EFSA'nın CONTAM Paneli, ZEA için vücut ağırlığı kg başına 0,25 µg günlük tolere edilebilir miktar olarak belirlemiştir (EFSA 2011).

ZON dünyada her iklim bölgesinde yetişebilmesi ve özellikle direk toksin gibi değil de hormon benzeri kimyasal bir yapı ile göstermesi nedeniyle oldukça büyük önem taşımaktadır. Kontaminasyonu tarladan başlayıp özellikle rutubet ve ısı şartları uygun olmayan durumlarda büyük problemlere yol açabilmektedir. ZON'un mutajenik ve kanserojenik etkilere sahip olduğu ve 1-5 ppm'lik düzeylerde fizyolojik hazarlar oluşturabildiği belirtilmektedir (Tiryaki vd. 2011). ZON'un kimyasal yapısı Şekil 2.3'de verilmiştir (Hussein ve Brasel 2001).



Şekil 2.3 ZON'un kimyasal yapısı

T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Zearalenon düzeyi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Anonim 2008).

Çizelge 2.4 T.G.K. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği'ne göre tahıllarda bulunabilecek maksimum Zearalenon düzeyi.

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
İşlenmemiş tahıllar (mısır hariç)	100
Doğrudan tüketime sunulan tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl unları, kepek (son ürün olarak) ve embriyo	75

İstanbul ilinde yapılan çalışmada 112 farklı un örneğinde (25 tam buğday unu, 29 beyaz un, 30 çavdar unu ve 28 kepekli un) Aflatoksinin yanı sıra ZON düzeyleri de LC-MS/MS cihazı ile tespit edilmiştir. Çalışma sonunda 15 un örneğinde $0,04-3,04 \pm 0,0018$ µg/kg arasında ZON tespit edilmiş olmakla birlikte bu değerlerin hepsi T.G.K.'nin belirlediği kabul edilebilir limitlerin altında kalmıştır (Türkeşsiz ve Bostan 2020).

Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada 240 adet tahıl ve tahıl ürünüde HPLC yöntemi ile ZON içeriği araştırılmıştır. Araştırma sonucunda incelenen örnekler içerisinde iki buğday, üç mısır, on bir çeltik ve iki buğday unu örneğinde sırasıyla ortalama 1.34, 28.0, 42.9 ve 2.66 µg/kg ZON tespit edilmiş ve sadece bir çeltik örneğindeki miktar Avrupa Komisyonu'nun belirlediği üst limiti aşmıştır. Ancak arpa, bulgur, buğday ekmeği, makarna ve bisküvi ürünlerinde ZON tespit edilmemiştir (Golge ve Kabak 2020).

Romanya'da yapılan bir çalışmada 31 işlenmemiş buğday ve 36 beyaz buğday unu ZON içeriği bakımından incelenmiş ve 4 buğday örneğinde 327-1135 µg/kg, 2 buğday unu örneğinde de 51-73 µg/kg arasında ZON tespit edilmiştir (Stanciu vd. 2017).

Başka bir çalışmada 381 farklı tahıl ve tahıl bazlı örnekte HPLC yöntemi ile ZON tespiti yapılmış ve örneklerin 8'inde 25-74 µg/kg arasında ZON tespit edilmiştir. Bu değerler de T.G.K.'nin belirlediği kabul edilebilir limitlerin altında kalmıştır (Bakırcı 2014).

Dünya çapında birçok ülkede de ZON tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Buğday örneklerinde ZEA insidansı Çin'de %12.8 (10,1–3049 µg/kg) (Ji vd. 2014), Finlandiya'da %46.7 (1,9–234 µg/kg) (Nathanail vd. 2015), Macaristan'da %17 (50–98 µg/kg) (Tima vd. 2016), İtalya'da %35 (7–231 µg/kg) (Alkadri vd. 2014), Romanya'da %13 (327–1135 µg/kg) (Stanciu vd. 2017) ve Kenya'da %57 (1–96 µg/kg) vd. 2008) olarak gösterilmiştir.

2.2. Tahıllarda Rutubet ve Su Aktivitesi

Tahıllar insan beslenmesinde önem bir yer tutmakta ve yılın her dönemi tüketilmektedir. Ancak tahıl üretimi yılın sadece belli bir döneminde gerçekleşmektedir. Yılın her dönemi ürün sağlayabilmek için de yeni mahsul dönemine kadar hatta bazen daha uzun süre depolanması gerekmektedir. Ancak yapı itibariyle düşük nem içeriğine sahip bu ürünlerin uygun koşullarda depolanmaması üründe kalitatif ve kantitatif kayıplara neden olmaktadır (Keskin ve Özkaya 2013).

Tahıllarda rutubet miktarı, hasat sürecinde tohumların olgunlukları ve hasat sonrası kurutma sürecine göre değişmektedir. Bu miktar mikroorganizma gelişimi ve enzimatik aktivite için önemli bir parametredir. Tahıllar için ideal ürün rutubeti %12-13 olup genellikle %14 ve altı uygun değer olarak kabul edilmektedir (Sumiahadi 2020). Bu oranların tahıllarda meydana gelebilecek değişiklikleri ve zararlı üretimini en aza indirmek için kritik limit olduğu belirtilmektedir (Keskin ve Özkaya 2013). Tahıllar genellikle modern biçim yöntemleriyle %16-20 nem oranında hasat edilmektedir. Ancak küf ve mikotoksin oluşumunun önlenmesi için hasat edilen tahılların nem içeriğinin <%14.5 nem içeriğine kadar kurutulması gerektiği belirtilmektedir (Magan vd. 2010). Ürünlerde artan rutubet miktarı, yüksek nispi nem oluşumuna neden olarak mikroorganizmaların çoğalma riskini artırırken, düşük rutubet miktarı düşük nispi nem sağlayarak mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir (Sumiahadi 2020). Ülkemizde de 2013/9 Tebliğ No'lu Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği ile buğday unları için maksimum nem limiti %14,5 olarak belirtilmiştir (Anonim 2013).

Mikotoksin üretimi, mantar türüne, üzerinde geliştiği ham maddeye ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Mantarların gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerindeki en önemli iki çevresel faktör ise su aktivitesi (a_w) ve sıcaklıktır (Oviedo vd. 2011; Pose vd. 2010). Su aktivitesi mikrobiyal ve kimyasal değişimin kontrol edilmesinde önemli bir göstergedir. Dolayısıyla gıdaların su aktivitelerinin belirlenmesi fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kararlılıkları için önemli bir göstergedir (Ertugay 2006; Oviedo vd. 2011). Teorik olarak su aktivitesi, gıda denge buhar basıncının (P) aynı sıcaklıktaki saf suyun denge buhar basıncına (P_0) oranı ($a_w = P/P_0$) veya gıda ile dengede bulunan havanın bağlı nemi (%Rh) ile ifade edilmektedir. Bu değer 0 ila 1 arasında değişmekte olup genel olarak

yüksek (a_w 0,90-1,00), orta (a_w 0,60-0,90) ve düşük (a_w <0,60) olarak üç gruba ayrılmaktadır. Orta a_w değerine sahip gıdalarda özellikle küf ve mikotoksin oluşumunun riskli olduğu belirtilmektedir. *Aspergillus flavus*'un 0,78-0,80 a_w arasında gelişebildiği ve 0,85 a_w altında Aflatoksin oluşumunun durduğu belirtilmektedir. OTA üretebilen *A. Ochraceus*'un ise 0,95 a_w civarında optimum gelişim gösterdiği ve 0,76 a_w altında OTA oluşumunun durduğu belirtilmektedir (Özay vd. 1993). Genel olarak bozulma etkeni küflerin gelişmesi için gereken minimum su aktivitesi 0,80 olarak belirtilmektedir. %15-17 oranında su içeren gıdalar ve unların su aktivitesinin 0,87-0,80 aralığında olduğu ve bu aralıkta *Penicillium chrysogenum*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* ve *A. ochraceus* üreyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca su aktivitesi 0,50-0,60 aralığında hiçbir mikroorganizmanın gelişemediği ve 0,40 a_w 'de hiçbir mikrobiyal faaliyetin gerçekleşmediği belirtilmektedir (Anonim 2000). Bazı küf cinsleri tarafından mikotoksin oluşumu ve gelişimi için gerekli su aktivitesi değerleri Çizelge 2.5'de verilmiştir (Mannaa ve Kim 2017).

Çizelge 2.5. Bazı küf cinsleri tarafından mikotoksin oluşumu ve gelişimi için gerekli minimum ve optimum su aktivitesi.

Küfler	Ürettiği toksin	Minimum su aktivitesi	Optimum su aktivitesi
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksin	0,78-0,84	0,95-0,99
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Okratoksin	0,93-0,98	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoksin	0,81-0,82	0,95-0,99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Okratoksin	0,77-0,83	0,96-0,98
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenone	-/0,90	-/0,98
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Ochratoxin A	0,82-0,85	-
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxin A	0,80-0,81	0,90-0,95

-Belirtilmemişti

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Araştırma materyalleri Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde (Sinanpaşa, Emirdağ, Bolvadin, Sandıklı, Şuhut, Dinar) faaliyet gösteren çeşitli zahirecilerin (buğday tedarikçisi) ve ekmeklik un değirmenlerinin betonarme depolarından sağlanmıştır. Toplam 20 adet ekmeklik buğday örneği alınmıştır. Bu örneklerden ilk 11 tanesi (1-11) Aralık 2021’ de son 9 adet (12 - 20) numunede Eylül 2022’ de temin edilmiştir.

Bu araştırmada, Sigma ve Merck analitik grade ürünler, Whatman marka filtre kağıtları ve R-Biopharm marka immünoafinite kolonları (IAK) kullanılmıştır. Besin çözeltileri monodistile su ve diğer çözeltiler ise bidistile su ile hazırlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Toplam Aflatoksin ve Aflatoksin B1 Tespiti

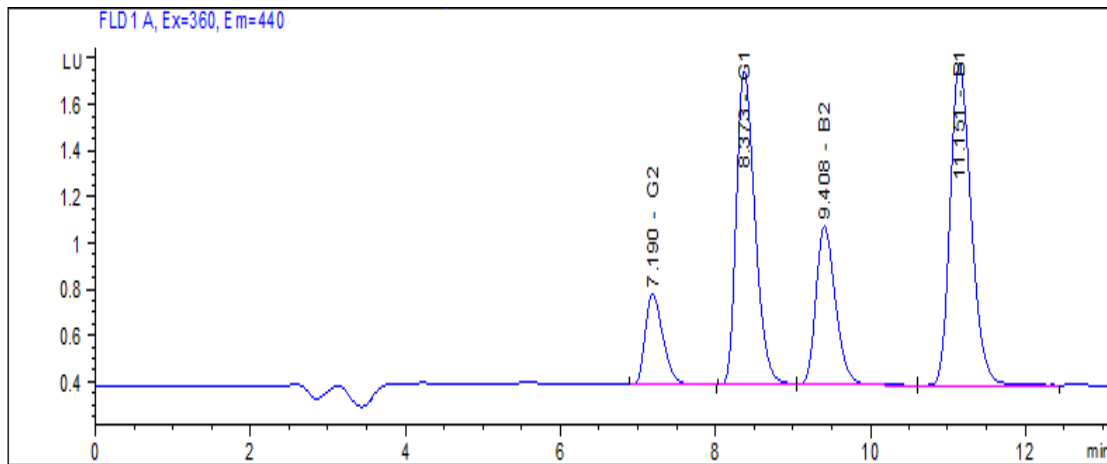
Test numunelerinin kolon sonrası türevlendirme ile HPLC ‘de Aflatoksin B1 ve Toplam Aflatoksin ($B_1+B_2+G_1+G_2$) miktarı tespit edilmiştir. Aflatoksin analizi, Stroka vd (2003) tarafından ayrıntıları verilen AOAC (2003.02) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Aflatoksin tayini için kullanılan HPLC-IAK analiz yönteminin prensibi; örneğe uygulanan ön işlem sonrası (örnekleme, ekstraksiyon, ekstraktın temizlenmesi, immunoaffinity safhası, HPLC enjeksiyon) kantitatif analiz ilkesine dayanmaktadır (AOAC 2003.02).

50 g numune blender kabında tartıldı ve üzerine 250 mL ekstraksiyon solventi (%85’lik aseton) ilave edildi. Blenderin kapağı kapatılarak yüksek hızda 2-3 dakika süre ile karıştırıldı. Ekstrakt, aşağıdan yukarıya doğru sıralanmak üzere Whatman 4, adi filtre, cam yünü ile katlı filtre kağıdından süzüldü. Filtratın 5.0 mL ‘si pipetle alınarak temiz bir erlene aktarıldı. Ardından erlene 95 mL su ilave edilip iyice karıştırılarak İmmünoafinite kolonuna konulmaya hazır hale getirildi. AflaTest İmmünoafinite kolonu enjektöre sabitlendi ve PBS ile seyreltilmiş olan numunenin 50 mL’si enjektöre aktarıldı. Numune

vakum pompası yardımıyla saniyede 1-2 damla sabit hızla AflaTest İmmünoaffinite kolonundan geçirildi. Kolondaki süzütünün tamamen geçmesi sağlandıktan sonra, kolondan yaklaşık 2 damla/saniye sabit hızla 15 mL su geçirerek kolon yıkandı. Ardından kolona 0.75 mL metanol aktarılıp kendiliğinden vial akması sağlandı. Sonrasında da 1 mL metanol ile aynı işlem tekrarlandı. Kolonun havası iyice alınıp kolondan 3.25 mL su geçirilerek vialin toplam hacmi 5 mL 'ye tamamlandı. Vorteksde karıştırılır HPLC'ye 100 µL enjekte edildi (AOAC 2003.02).

3.2.1.1. Aflatoksin HPLC Analizi

Elde edilen örneklerdeki Aflatoksin'in kantitatif analizi izokratik koşullarda floresans detektörlü HPLC cihazı ile yapılmıştır. Cihaza bağlı olarak vakum degaser, izokratik pompa ve otomatik enjeksiyon sistemi yer almaktadır. Analiz için ACE 5 C18 (250x4.6 mm) kolon ve Saf Su: Asetonitril: Metanol (6:2:3 v/v/v)'den oluşan mobil faz kullanıldı. Mobil fazın litresinde 120 mg Potasyum Bromür ve 100 µL %65'lik Nitrik Asit ilave edilir. Kolon sıcaklığı 25°C, pompa akış hızı 1 ml/dakika, eksitasyon dalga boyu 360 nm ve emisyon dalga boyu 440 nm olarak ayarlandı. Kolon sonrası türevlendirmenin yapılabilmesi için Kobra Cell kullanıldı. Kobra cell floresans dedektöre bağlandı ve pompa en az 5 dakika çalıştırıldı. 100 mA akım sağlanarak 15 dakika beklendi ve analiz başlatıldı. Tüm ayarlamalar sonunda her bir örnekten bir defa olmak üzere HPLC cihazına 100 µl enjeksiyon yapılarak sonuçlar elde edildi (AOAC 2003.02). Aflatoksin standartlarına ait HPLC kromatogramı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 standartlarının HPLC kromatogramı

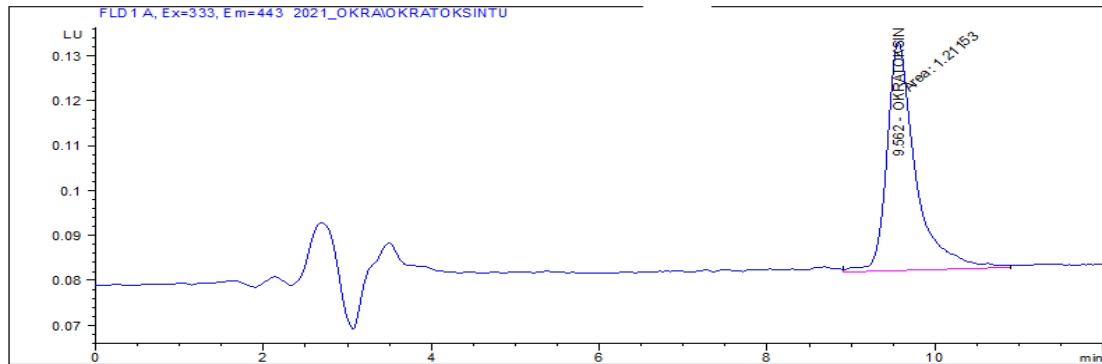
3.2.2. Okratoksin A Tespiti

50 g numune blender kabında tartıldı ve üzerine 5 g sodyum klorür ilave edildi. Ardından 200 ml %60 lık asetronitril-su karışımı ilave edilerek blender de 3 dakika yüksek hızda karıştırıldı. Sonrasında ekstrakt, aşağıdan yukarıya doğru sıralanmak üzere Whatman 4, adi filtre, cam yünü katlı filtre kâğıdından süzüldü. Erlene 22 ml PBS alınıp üzerine süzüntüden 2 ml ilave edildi. Elde edilen karışımın tamamı enjektöre alındı ve dakikada 2 ml olacak şekilde vakum pompası yardımıyla IAK (R-Biopharm)’tan geçirildi. Süzüntü IAK’tan tamamen geçtikten sonra 20 ml PBS enjektöre ilave edilip kolondan geçirilerek kolonun temizlenmesi sağlandı. IAK vakum pompasından çıkarıldıktan sonra bir vialle takıldı ve IAK’tan 1,5 ml asetik asetronitril:metanol (2:98) karışımı saniyede 1 damla olacak şekilde geçirilip vialde toplandı. Arkasından 1,5 ml ultra saf su geçirildi ve vialin toplam hacmi 3 ml’ye tamamlandı. Elde edilen çözeltinin 100 µl’si HPLC cihazına enjekte edildi (R-Biopharm 2021 a, İnt. Kyn.1).

3.2.2.1. Okratoksin A HPLC Analizi

Elde edilen örneklerdeki Okratoksin A’nın kantitatif analizi izokratik koşullarda floresans detektörlü HPLC cihazı ile yapılmıştır. Cihaza bağlı olarak vakum degaser, izokratik pompa ve otomatik enjeksiyon sistemi yer almaktadır. Analiz için İnertsil ODS2 (250x4.6 mm) kolon ve Asetonitril:Saf Su:Asetik Asit (51:47:2 v/v/v)’den oluşan mobil faz kullanıldı. Kolon sıcaklığı 40°C, pompa akış hızı 1 ml/dakika, eksitasyon dalga boyu 333 nm ve emisyon dalga boyu 443 nm olarak ayarlandı. Tüm ayarlamalar sonunda her bir örnekten bir defa olmak üzere HPLC cihazına 100 µl enjeksiyon yapılarak sonuçlar elde edildi (R-Biopharm 2021a, İnt. Kyn.1).

Okratoksin standardına ait HPLC kromatogramı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Okratoksin standardının HPLC kromatogramı

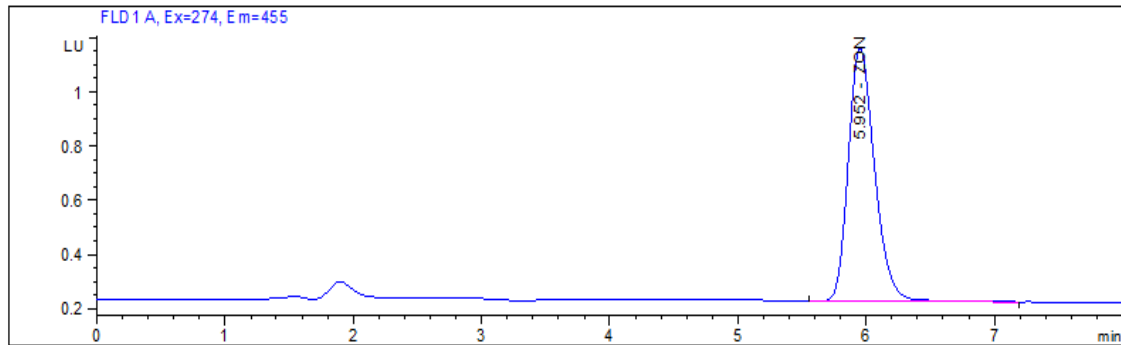
3.2.3. Zearalenon Tespiti

Bir blender kabında $50 \pm 0,1$ g numune tartıldı ve üzerine 250 ml ekstraksiyon solventi (%75'lik asetonitril) ilave edildi. Blenderin ağzı kapatılarak 2 dakika yüksek devirde karıştırılıp whatman no: 4 filtre kağıdından süzüldü. Süzüntüden 20 ml, bir erlenmayere alındı ve üzerine 80 ml PBS ilave edilip iyice karıştırıldı. pH'sının 7,4 olup olmadığı kontrol edildi, değilse de ayarlandı. Elde edilen karışımdan 25 ml alınarak 50 ml'lik enjektör vasıtasıyla IAK (R-Biopharm)'tan vakum pompası yardımıyla 1-2 damla/sn hızla geçirildi. Ardından 20 ml PBS kolondan 1-2 damla/sn hızla geçirilerek kolonun temizlenmesi sağlandı. Vakum pompasından çıkarılan IAK bir viale takıldı ve saniyede 1 damla hızla 1,5ml asetonitril geçirildi. Ardından IAK'tan 1,5 ml saf su geçirilerek vialin toplam hacmi 3 ml'ye tamamlandı. Elde edilen bu çözeltiden HPLC cihazına 100 μ L enjeksiyon yapıldı (R-Biopharm 2021 b, İnt. Kyn.2).

3.2.3.1. Zearalenon HPLC Analizi

Elde edilen örneklerdeki Zearalenon'nun kantitatif analizi floresans detektörlü HPLC cihazı ile yapılmıştır. Cihaza bağlı olarak vakum degaser, izokratik pompa ve otomatik enjeksiyon sistemi yer almaktadır. Analiz için İnertsil ODS-3V (5 μ m, 4.6 mm x 150 mm) kolon ve Saf Su/Acetonitril/Metanol'den (46/46/8 v/v/v)'den oluşan mobil faz kullanıldı. Kolon sıcaklığı 40°C, pompa akış hızı 1 ml/dakika, eksitasyon dalga boyu 274 nm ve emisyon dalga boyu 455 nm olarak ayarlandı. Tüm ayarlamalar sonunda her bir örnekten bir defa olmak üzere HPLC cihazına 100 μ l enjeksiyon yapılarak sonuçlar elde edildi (R-Biopharm 2021 b, İnt. Kyn.2).

Zearalenon standardına ait HPLC kromatogramı Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Zearalenon standardının HPLC kromatogramı

3.2.4. Rutubet Miktarı Tayini

Tahılların rutubet miktarı tayini TS/1135 ISO/712'ye göre yapıldı. Numune bir blender da öğütüldü. Kapağı ile birlikte sabit tartıma getirilmiş kurutma kabına 5 ± 1 g öğütülmüş veya öğütülmemiş deney numunesi 1 mg hassasiyetle tartıldı. Numunelerin öğütülüp öğütülmemesi tane büyüklüğüne bağlı olarak karar verildi. Kurutma kapları (kapakları ile birlikte) kapakları kapatılmadan etüve yerleştirildi. Sıcaklık $130-133^{\circ}\text{C}$ ' ye ulaştıktan sonra 120 ± 5 dk kurumaya bırakıldı. Sürenin sonunda kurutma kaplarının kapakları kapatılarak desikatöre alındı ve 30-40 dakika soğuyuncaya kadar beklendi. Ardından kurutma kapları 1 mg duyarlılıkla tartıldı. Elde edilen son tartım ile birlikte % rutubet miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$W(\%) = [1 - (m_1/m_0)] \times 100$$

W= Kütlece rutubet muhtevası(%)

m_0 = Deney numunesinin kütlesi(g)

m_1 = Kurutma işleminden sonra deney numunesinin kütlesi(g)

3.2.5. Su Aktivitesi Tayini

Numunelerin su aktivitesi tayini TS 7474'e göre yapıldı. Farklı aw değerine sahip primer standartlar kullanılarak serbest su miktarı su aktivitesi tayin cihazı (Aqualab 4TE) ile tespit edildi.

Numuneler analize kadar kuru, nemsiz ve buzdolabında saklandı. Buzdolabından alınan numuneler analiz sıcaklığına ($20-25^{\circ}\text{C}$) getirilmek için 1-2 saat laboratuvar şartlarında bekletildi ve ardından blender ile öğütüldü. Fazla bekletilmeden yarısını geçmeyecek şekilde numune kabına konup cihaza yerleştirildi. Cihazın kapağı kapatılıp okuma işlemi başlatıldı. İki ayrı okuma yapıp ortalaması alınarak sonuç aw değeri olarak verildi.

3.2.6. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar paralel olarak yapılan analizlerin ortalama $\pm$ standart sapması olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Afyonkarahisar yöresindeki farklı işletmelerden sağlanmış olan 20 adet ekmeklik buğday örneğine ait Aflatoksin, Okratoksin A, Zearalenon varlığı, rutubet miktarı ve su aktivitesi tespit edilmiştir.

4.1. Ekmeklik Buğdaylarda Mikotoksin Analizi

Numunelerdeki mikotoksin varlığı HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Yöntem validasyonu amacıyla geri kazanım çalışması yapılmıştır. Çalışmada analiz edilen mikotoksinlerin standart solüsyonlarının kalibrasyon eğrisi ile hesaplanan LOD (Limit of detection, S/N=3,3) ve LOQ (Limit of quantification, S/N=10) değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ekmeklik Buğdaylarda mikotoksin analizlerinin geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.

Mikotoksinler	Geri Kazanım (%)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
AFB1	92,50	0,01	0,6
Toplam Aflatoksin	*		
Okratoksin	97,30	0,1	0,5
Zearalenon	97,70	1	5,5

*B1, B2, G1 ve G2 parametrelerinden en az ikisinin olması durumunda hesaplanabilen bir değerdir.

Analiz edilen numunelerde tespit edilen Aflatoksin, Okratoksin A ve Zearalenon miktarları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Buna göre 6, 10 ve 14 nolu numunelerde hiçbir mikotoksin tespit edilmemişken, 2 nolu numunede tüm mikotoksin türleri tespit limitlerinin üzerinde bulunmuştur.

Çizelge 4.2 Afyonkarahisar yöresinde farklı işletmelerden sağlanmış olan ekmeklik buğday örneklerinde tespit edilen Aflatoksin, Okratoksin A ve Zearalenon miktarları (ppb).

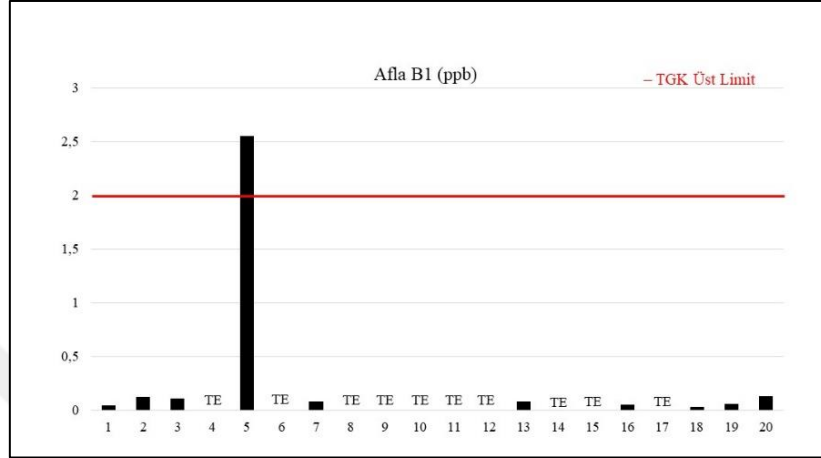
Numune	Toplam Aflatoksin		Okratoksin A (ppb)	Zearalenon (ppb)
	AFB1 (ppb)	(ppb)		
1	0,047	0,064	TE	3,3
2	0,12	0,12	0,66	2,07
3	0,11	0,11	5,9	2,14
4	TE	TE	TE	5,65
5	2,55	3,01	TE	193
6	TE	TE	TE	TE
7	0,078	0,93	TE	TE
8	TE	TE	TE	20,82
9	TE	TE	0,76	TE
10	TE	TE	TE	TE
11	TE	TE	TE	2,77
12	TE	TE	0,17	TE
13	0,078	0,11	TE	TE
14	TE	TE	TE	TE
15	TE	TE	0,75	TE
16	0,054	0,054	0,52	TE
17	TE	TE	0,79	18,28
18	0,031	0,031	TE	TE
19	0,058	0,073	TE	TE
20	0,13	0,23	TE	TE

TE: Tespit Edilemedi

Mikotoksin analiz sonuçları ekmeklik buğday örneklerinin %12'lik neme göre düzeltilmiş ve geri kazanım oranları ile hesaplanmış sonuçlardır.

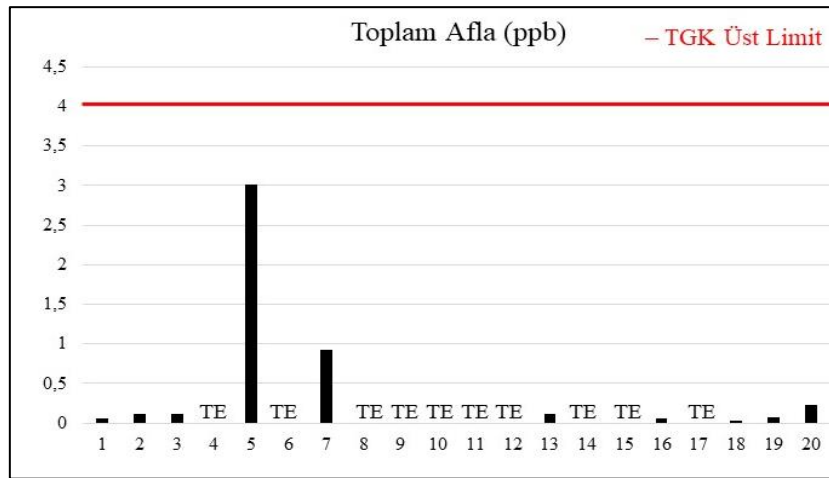
Örneklerin Standart Sapması $< \pm 0,01$ ' dir.

Test numunelerinin AFB1 içeriklerine bakıldığında, 10 numunede AFB1 tespit edilmezken, 10 numunede tespit edilen AFB1 düzeyleri 0,031-2,55 ppb arasında değişmiştir. 5 nolu numunede tespit edilen AFB1 miktarı (2,55 ppb) ise Türk Gıda Kodeksi üst limitlerinin (2 ppb) üzerinde bulunmuştur (Şekil 4.1).



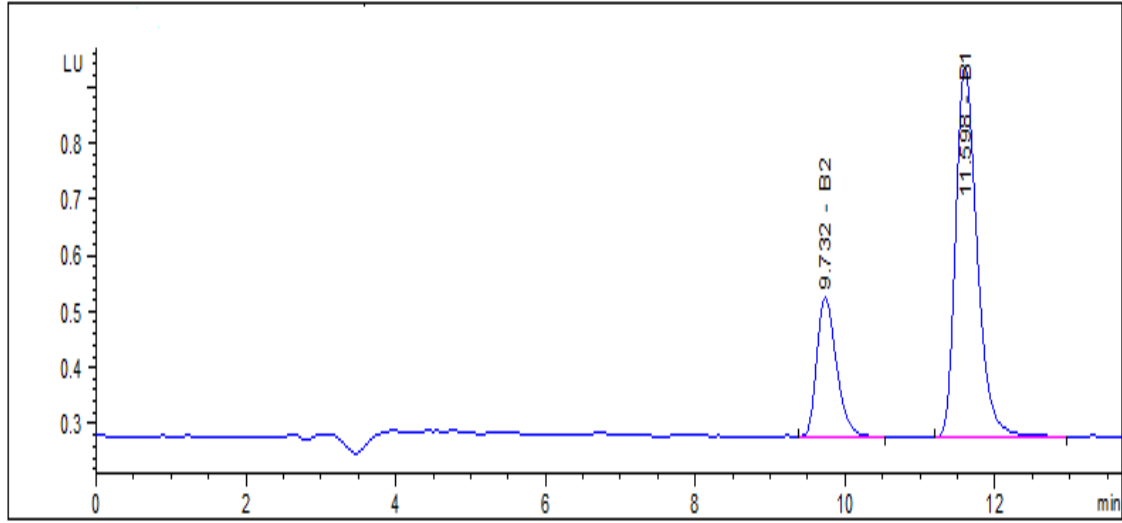
Şekil 4.1 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait AFB1 içeriği (ppb).

Test numunelerinin Toplam Aflatoksin içeriğine bakıldığında 10 numunede Aflatoksin tespit edilmezken, 10 numunede tespit edilen Toplam Aflatoksin düzeyleri 0,031-3,01 ppb arasında değişmiştir. Numunelerde tespit edilen Toplam Aflatoksin miktarları Türk Gıda Kodeksi üst limitlerinin (5 ppb) altında kalmıştır (Şekil 4.2).



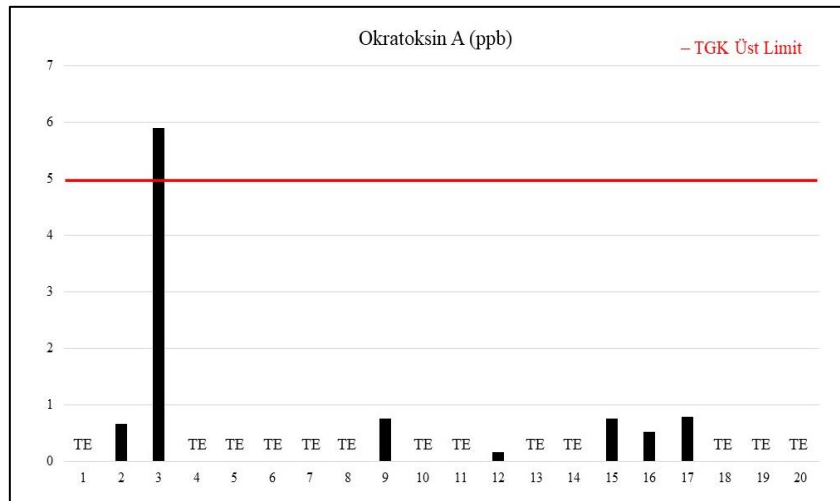
Şekil 4.2 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait Toplam Aflatoksin içeriği (ppb).

Şekil 4.3 'te araştırmada analiz edilen bir ekmeklik buğday örneğine (5 no'lu örnek) ait Aflatoksin (B1 ve B2) HPLC kromatogramı verilmiştir.



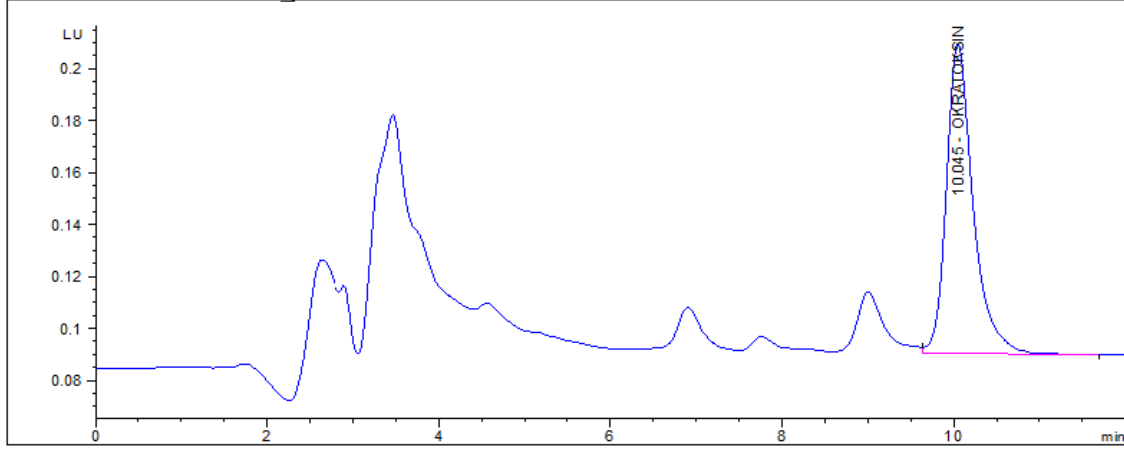
Şekil 4.3 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneğine ait Aflatoksin HPLC kromatogramı (5 no'lu örnek).

Ekmeklik buğdaylara ait test numunelerinin Okratoksin A içeriğine bakıldığında 13 numunede Okratoksin A tespit edilmezken, 7 numunede tespit edilen Okratoksin A düzeyleri 0,17-5,9 ppb arasında değişmiştir. 3 nolu numunede tespit edilen Okratoksin A miktarı (5,9 ppb) ise Türk Gıda Kodeksi üst limitlerinin (5 ppb) üzerinde bulunmuştur (Şekil 4.4).



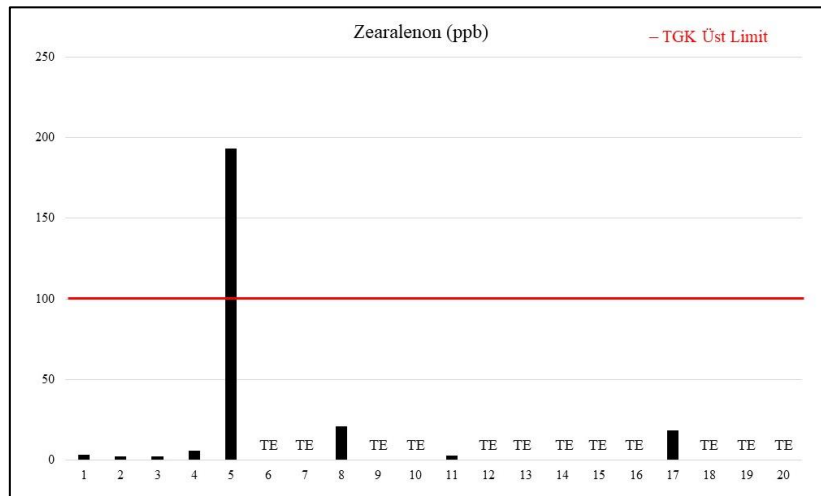
Şekil 4.4 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait Okratoksin A içeriği (ppb).

Şekil 4.5 'te araştırmada analiz edilen bir ekmeklik buğday örneğine (3 no'lu örnek) ait Ochratoxin HPLC kromatogramı verilmiştir.



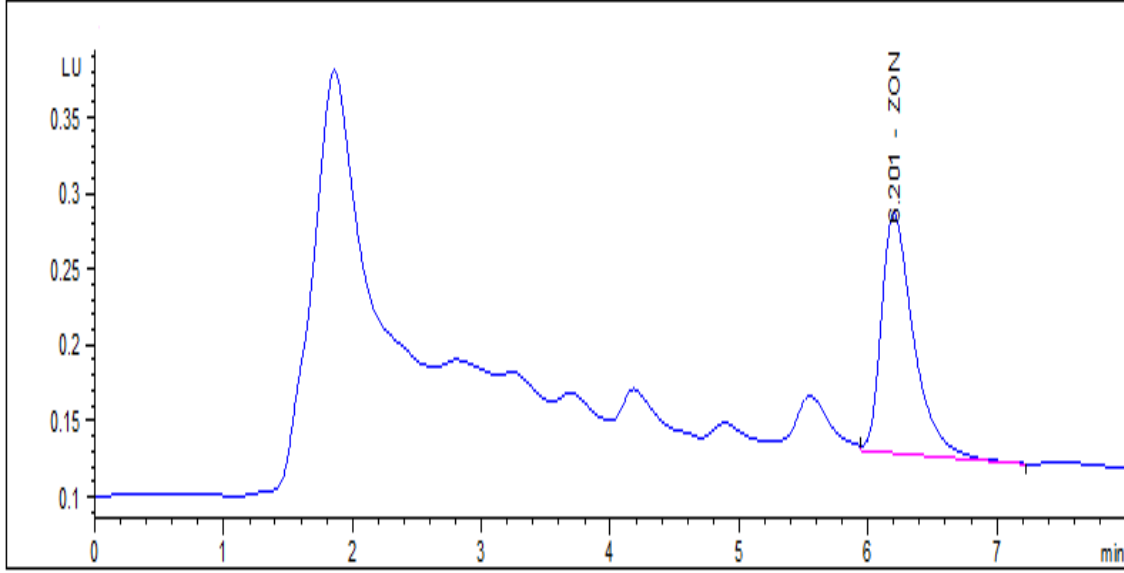
Şekil 4.5 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneğine ait Ochratoxin HPLC kromatogramı (3 no'lu örnek).

Mikotoksin analizlerinde kullanılan ve Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden toplanılan ekmeklik buğday test numunelerinin Zearalenon içeriğine bakıldığında 12 numunede Zearalenon tespit edilmezken, 8 numunede tespit edilen Zearalenon düzeyleri 2,07-193 ppb arasında değişmiştir. 3 nolu numunede tespit edilen Zearalenon miktarı (193 ppb) ise Türk Gıda Kodeksi üst limitlerinin (100 ppb) üzerinde bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneklerine ait Zearalenon içeriği (ppb).

Şekil 4.7 'de araştırmada analiz edilen bir ekmeklik buğday örneğine (5 no'lu örnek) ait Zearalenon HPLC kromatogramı verilmiştir.



Şekil 4.7 Afyonkarahisar yöresindeki çeşitli işletmelerden sağlanmış ekmeklik buğday örneğine ait Zearalenon HPLC kromatogramı (5 no'lu örnek).

4.2. Ekmeklik Buğdayların Rutubet Miktarı ve Su Aktivitesi

Analizi yapılan ekmeklik buğdaylarda tespit edilen rutubet miktarı ve su aktivitesi Çizelge 4.3'de verilmiştir. Buğdayların rutubet miktarı ortalama %11,09 olurken en yüksek %15,23 (5. Örnekte), en düşük %10,65 (11. Örnekte) olarak bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği'nde belirtilen maksimum nem düzeyini (%14,5) aşan sadece bir örnek (5. Örnek) tespit edilmiştir. Su aktivitesi ise ortalama 0,685 bulunurken en yüksek 0,696 (19. Örnekte), en düşük 0,675 (18. Örnekte) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Ekmeklik buğdaylarda tespit edilen rutubet miktarları ve su aktivitesi.

Numune	Rutubet (%)	Su Aktivitesi
1	10,72	0,684
2	10,70	0,676
3	10,93	0,692
4	11,12	0,688
5	15,23	0,679
6	10,93	0,682
7	11,10	0,689
8	10,70	0,677
9	11,13	0,693
10	10,65	0,681
11	10,88	0,685
12	10,87	0,694
13	10,77	0,695
14	10,95	0,679
15	10,83	0,683
16	10,87	0,694
17	10,95	0,678
18	10,75	0,675
19	10,93	0,696
20	10,73	0,679

Örneklerin Standart Sapması $< \pm 0,01$ ' dir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Buğday Türkiye de dahil olmak üzere dünya çapında en önemli temel gıda ürünlerinden biridir. Türk nüfusunun çoğunluğu için başlıca karbonhidrat kaynaklarından biridir. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre Türkiye’de 2020 yılında buğday üretimi %7,9 artarak 20,5 milyon tona ulaşırken 2021 yılından %13,9 oranında azalarak yaklaşık 17,7 milyon ton olarak bildirilmiştir (TÜİK 2021). 2022 yılında ise bir önceki yıla göre %20,7 oranında artarak yaklaşık 38,5 milyon ton olacağı tahmin edilmiştir (TÜİK 2022).

Türkiye'nin iklim koşulları mikotoksijenik küf gelişimine elverişlidir ve bu nedenle mahsuller hem hasat öncesi hem de hasat sonrası dönemlerde Aflatoksin, Okratoksin ve Zearalenon gibi mikotoksinlerle kontamine olabilmektedir. Bu toksinlerine maruz kalanlar özellikle buğday ve mısır bazlı olmak üzere tahıl türevli ürünlerdir. Mikotoksinler yüksek derecede ısıya dayanıklı olduklarından ve geleneksel ısı işlemlerle kolayca yok edilemediğinden ekmek, unlu mamüller, un ve bunların ürünlerinde de bulunabilir. Dünya’nın çeşitli ülkelerinden buğday ve diğer tahılların Aflatoksin, Okratoksin ve Zearalenon ile kontaminasyonu bildirilmiştir (Algül ve Kara, 2014; Calori-Domingues vd., 2016; Daou vd., 2021; Giray vd., 2007; Golge ve Kabak, 2020; Hathout vd., 2020). Bu nedenle gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak için buğday ve diğer tahıllarda mikotoksinler açısından bir izleme gerekmektedir. Ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi tarafından 2008/26 tebliğ numaralı Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği’ne göre farklı gıdalar için Aflatoksin, Okratoksin, Zearalenon ve diğer mikotoksinler için maksimum limitler belirlenmiştir (Anonim 2008).

5.1.1. Ekmeklik Buğdaylarda Aflatoksin Analizinin Değerlendirilmesi

Analiz edilen 20 ekmeklik buğday numunelerin %50'sinde (10 adedinde Aflatoksin) B1 ve Toplam Aflatoksin tespit edilmiştir. Örneklerin 10 adedinde ise ölçülebilir sınırlar içerisinde Aflatoksin belirlenememiştir. Tespit edilen AFB1 ve Toplam Aflatoksin miktarları sırasıyla 0,031-2,55 ppb ve 0,031-3,01 ppb aralığında bulunmuştur (Çizelge 8). Numunelerin 1 tanesinde (2,55 ppb) ise AFB1 miktarının Türk Gıda Kodeksi'ne göre, kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7). Özturan vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada Erzurum ilinden aldıkları 50 farklı buğday örneğinin 37 tanesinde AFB1 tespit ederken 8 tanesinde ise AFB1 miktarının T.G.K.'ye göre, kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğunu bildirmiştir (Özturan vd. 2007). Türkiye'nin bazı bölgelerinden alınan 41 adet buğday örneğinde Aflatoksin analizi yapılan başka bir çalışmada ise analiz edilen numunelerin %59'unda Aflatoksin kontaminasyonunun olduğu ve Toplam Aflatoksin konsantrasyonunun 10,4 ile 643,5 ng/kg arasında olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen miktarların T.G.K.'ye göre belirlenen maksimum limitlerin (4 µg/kg) altında olduğu belirtilmiştir (Giray vd. 2007). Benzer şekilde İzmir ilinden alınan toplam 24 adet tahıl ve tahıl bazlı ürünlerin Aflatoksin analizinin yapıldığı bir çalışmada da, analiz edilen örneklerde Aflatoksin miktarının ölçüm limitlerinin altında olduğu tespit edilmiştir (Bakirci 2014). Çalışmamızda elde edilen bulgular literatür bilgisi ile benzer şekilde gerçekleşmiştir.

Sağlam ve Masatcıoğlu (2021)'nin Hatay'da yaptığı güncel bir çalışmada, analiz edilen 29 buğday numunesinin 13 tanesinde AFB1 tespit edilmiş ve tespit edilen AFB1 miktarlarının 0,136-0,484 µg/kg arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da önceki çalışmalar gibi, T.G.K. ve Avrupa Komisyonu'na göre işlenmemiş tahıl ürünlerinde AFB1'in maksimum limit değerinin (2 µg/kg) üstünde saptanan bir örnek bulunmamıştır (Sağlam ve Masatcıoğlu 2021). Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda da buğdaydaki Aflatoksin miktarı analiz edilmiştir. Lübnan'da yapılan bir çalışmada 312 buğday ve buğday ürünlerinin 205 adedinde AFB1 0,04-6,21 µg/kg aralığında olduğu bildirilmiştir. Tespit edilen örneklerin 2 tanesinin Avrupa komisyonunun belirlediği üst limitleri aştığı saptanmıştır (Daou vd. 2021). İran'da yapılan bir çalışmada ise, 25 farklı fabrikadan alınan toplam 200 buğday örneği toplanarak Aflatoksin analizi HPLC yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, buğday unu numunelerinin kış ve yaz

aylarında ortalama Aflatoksin miktarları sırasıyla 0,99 ng/g ile 0,82 ng/g olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma ile Aflatoksin kontaminasyon seviyelerinin kışın yaza göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Taheri vd. 2012).

Ülkemizde tahıl ve tahıldan elde edilen ürünler (ekmeklik un, bulgur, ekmek, bisküvi, hazır konfeksiyon fırın ürünleri, makarna vb) insanların günlük beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Tahıl taneleri hasat, taşıma, depolama ve işleme süreçlerinde sıklıkla mantarlar tarafından üretilen mikotoksin kontaminasyon riski taşımaktadır ve oluşan toksinlerin halk sağlığı açısından oluşturacağı riskler belirtilmiştir (Girgin vd. 2001a; Magan vd. 2011). Türkiye’de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda buğday unları ve diğer tahıl unlarının kontamine olduğu Aflatoksin miktarları saptanmıştır (Algül ve Kara 2014; Armorini vd. 2015; Büyükünöl ve Vural 2007). Türkiye’nin 14 farklı ilinden alınan 18 adet mısır unu örneği ve İngiltere’den alınan 3 adet mısır unu örneği ile Aflatoksin analizinin yapıldığı bir çalışmada, Aflatoksin analizi HPLC cihazı ile belirlenmiştir. Türkiye’nin farklı illerinden alınan 18 farklı mısır unu örneklerinin AFB1 ve Toplam Aflatoksin miktarları sırasıyla 0,13-12,87 µg/kg ve 0,18-13,92 µg/kg arasında olduğu belirtilmiştir. Türkiye’den alınan örneklerin bir tanesinin AFB1 (12,87 µg/kg) ve Toplam Aflatoksin (13,92 µg/kg) düzeyleri T.G.K.’nin üst limitlerini aştığı bildirilmiştir. İngiltere’den alınan örneklerin 2 tanesinde Aflatoksin miktarının ölçüm limitlerinin altında olduğu tespit edilmiştir ve diğer örnekte ise Aflatoksin miktarı 0,13 µg/kg olarak tespit edilmiş ve bu değerin T.G.K.’nin yasal sınırının altında olduğu belirtilmiştir (Algül ve Kara, 2014). Benzer şekilde Türkiye’nin farklı illerinden (Erzurum, Ağrı, Iğdır) alınan 100 buğday unu numunelerinin içerdiği AFB1 ve Toplam Aflatoksin düzeyini ELISA yöntemiyle tespit edilen bir çalışmada, 57 örnekte AFB1 ve 71 örnekte de Toplam Aflatoksin tespit edilmiştir. Analiz yapılan örneklerin 5 tanesinde AFB1 (2,75-5,17 µg/kg) ve Toplam Aflatoksin miktarları (5,08-7,03 µg/kg) T.G.K. ve Avrupa Komisyonu’na göre maksimum limitleri aştığı bildirilmiştir (Büyükünöl ve Vural 2007).

Türkiye’de yapılan başka bir çalışmada, yedi farklı yerde üretilen toplam 100 buğday unu örneği toplanmıştır ve toplanan örneklerde Aflatoksin analizi ELISA ile yapılmıştır. Örneklerin %55’inde Aflatoksin miktarının ölçüm limitlerinin altında olduğu ve %2’sinin de T.G.K.’nin belirlediği üst limiti (4 µg/kg) aştığı tespit edilmiştir (Aydın vd. 2008).

İstanbul ilinde 112 farklı un örneği (25 tane tam buğday unu, 29 tane beyaz un, 30 tane çavdar unu ve 28 tane kepek unu) toplanarak yapılan bir çalışmada ise, Aflatoksin analizi LC-MS/MS cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 112 farklı un örneğinin 9 tanesinde (1 tane tam buğday unu, 6 tane çavdar unu, 2 tane kepek unu) Aflatoksin tespit edilmiştir. Örneklerin sadece bir tanesinde (çavdar unu) Toplam Aflatoksin düzeyi 5,95 µg/kg ile T.G.K.'nin belirlediği üst sınır değerin (4 µg/kg) üzerinde bulunmuştur (Türkeşsiz ve Bostan 2020).

İtalya'da 90 farklı organik ve geleneksel unlarda (20 geleneksel buğday unu, 20 organik buğday unu, 42 geleneksel mısır unu ve 8 organik mısır unu) AFB1 analizinin yapıldığı bir çalışmada, AFB1 analizi HPLC cihazıyla yapılmıştır. Geleneksel ve organik buğday unlarında AFB1 tespit edilememiştir. Mısır unu örneklerinin 13 tanesinde (9 tane geleneksel ve 4 tane organik mısır unu) AFB1 tespit edilmiştir ve tespit edilen AFB1 miktarların 0,17-3,75 µg/kg arasında değiştiği bildirilmiştir (Armorini vd. 2015).

5.1.2. Ekmeklik Buğdaylarda Okratoksin A Analizinin Değerlendirilmesi

Okratoksin A analizi yapılan 20 adet ekmeklik buğday numunelerinin 13 tane örnekte Okratoksin A miktarının ölçüm limitlerinin altında olduğu tespit edilmiştir ve 7 tane örnekte ise 0,17-5,9 ppb arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Örneklerin sadece bir tanesinde Okratoksin A düzeyi 5,9 ppb ile T.G.K. Bulaşanlar Yönetmeliği maksimum limitin (5 µg/kg) üzerinde bulunmuştur (Çizelge 2.3). İzmir'de yapılan bir çalışmada analizi yapılan 67 farklı tahıl ve tahıl bazlı ürünlerin 4 tanesinde Okratoksin A tespit edilmiştir. Analizi yapılan ürünlerin 2 tanesinde ise T.G.K.'nin belirlediği maksimum limitlerin üzerinde olduğu saptanmıştır (Bakirci 2014). Yapılan başka bir çalışmada 383 buğday örneğinin 327 adedinde Okratoksin A saptanmazken 56 adedinde ise 0,03-31,4 µg/kg aralığında saptanmıştır. Okratoksin saptanan örneklerin 4 adedinde ise Avrupa komisyonunun belirlediği maksimum limit olan 5 µg/kg'ı aştığı bildirilmiştir (Trucksess vd. 1999). Balkan ülkelerinde yapılan başka bir çalışmada da analiz edilen 92 buğday örneğinin 74 adedinde Okratoksin A tespit edilmiştir (Puntarić vd. 2001). Mısır'da yapılan bir çalışmada 36 adet buğday örneğinin 2 adedinde Okratoksin tespit edilmiştir. Okratoksin A tespit edilen örneklerin Avrupa komisyonunun belirlediği limitlerden düşük

olduğu belirtilmiştir (Hathout vd. 2020). Benzer şekilde Hindistan’da yapılan başka bir çalışmada da buğday örneklerinde tespit edilen Okratoksin düzeyleri Avrupa Komisyonunun belirlediği limitlerden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Viswanath vd. 2007). Çalışmamızda elde edilen bulgular literatür bilgisi ile benzer şekilde gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulguların aksine literatürde daha yüksek oranda Okratoksin tespit edilen çalışmalarda bulunmaktadır. Sağlam ve Masatcıoğlu (2021)’nin Hatay’dan alınan 29 farklı buğday örneğinde AFB1 ile birlikte Okratoksin A analizini HPLC cihazı ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonunda 24 örnekte 0,174-137,880 µg/kg arasında değişen miktarlarda Okratoksin A tespit edilmiştir. Bu örneklerin 5 adedinde ise tespit edilen Okratoksin A düzeyleri, T.G.K. ve Avrupa Komisyonu’na göre işlenmemiş tahıl ürünlerinde üst limit değerinden (5 µg/kg) daha fazla olduğu belirtilmiştir (Sağlam ve Masatcıoğlu 2021). Lübnan’da yapılan bir çalışmada 312 buğday ve buğday ürünlerinin tümünde Okratoksin 0,02-63,3 µg/kg aralığında tespit edilmiştir. Tespit edilen örneklerin 55 tanesinin Avrupa komisyonunun Okratoksin için belirlediği maksimum limitleri aştığı saptanmıştır (Daou vd. 2021). Benzer şekilde Cezayir’de yapılan başka bir çalışmada 81 buğday örneğinin 62 tanesinde Okratoksin A düzeylerini 0,84 ile 34,75 µg/kg aralığında saptanmıştır. Bu örneklerin 13 tanesinde Okratoksin A düzeylerinin Avrupa komisyonunun belirlediği üst limitleri aştığı belirtilmiştir (Zebiri vd. 2018).

Tahıllardan elde edilen unlar ve ekmeklerdeki Okratoksin A düzeyleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Türkiye (18 adet mısır unu) ve İngiltere’den (3 adet mısır unu) alınan toplam 21 farklı mısır unu örneklerinde Okratoksin A analizi yapılan bir çalışmada, 14 tane mısır unu örneğinde 0,37-25,34 µg/kg arasında olduğu tespit edilmiştir. Analizi yapılan mısır unu örneklerinde Okratoksin A düzeyi T.G.K.’nin üst limitlerinin (5 µg/kg) üzerinde çıkan 1 örnek (25,34 µg/kg) tespit edilmiştir. (Algül ve Kara 2014). Türkiye’de yapılan başka bir çalışmada ise, farklı illerden alınan 100 buğday unu numunelerinin 87 adedinde Okratoksin A tespit edilmiştir. Analiz edilen örneklerde Okratoksin A miktarının T.G.K. ve Avrupa Komisyonu’nun belirlediği maksimum limitlerin altında olduğu tespit edilmiştir (Büyükcinal ve Vural 2007). Portekiz’de 31 adet buğday ve 30 adet mısır ekmeğinde Okratoksin analizi yapan bir çalışmada, Okratoksin A insidansı

buğday ve mısır ekmeğinde sırasıyla %12,9 ve %70 olarak bulunmuştur. En yüksek Okratoksin A seviyeleri, mısır ekmeğinde olduğu tespit edilmiştir ve bir numunede Avrupa Komisyonunun belirlediği maksimum sınırını aştığı bildirilmiştir (Juan vd. 2008). Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise 102 adet buğday ekmeği örneklerinin 12 adedinde ortalama 1,58 µg/kg Okratoksin A tespit edilmiştir ve tespit edilen Okratoksin miktarlarının T.G.K.’nin yasal sınırını aşmadığı bildirilmiştir (Golge ve Kabak 2016). Bu çalışmalar sonucunda Okratoksin düzeylerinin belirlenen yasal sınırı aşan örnek sayısının az olduğu görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir. Bunların aksine Türkiye’de yapılan bir çalışmada, toplam 100 buğday unu örneğinde %81’inde Okratoksin miktarı tespit edilmiştir ve %28’sinin de T.G.K.’nin belirlediği işlenmemiş tahıllardan elde edilen tüm ürünler için maksimum limiti (3 µg/kg) aştığı tespit edilmiştir (Aydın vd. 2008).

5.1.3. Ekmeklik Buğdaylarda Zearalenon Analizinin Değerlendirilmesi

Zearaleon (ZEA) analizi yapılan 20 adet ekmeklik buğday numunelerinin 8 adedinde zearaleon miktarları tespit edilmiştir ve tespit edilen miktarların 2,07-193 ppb arasında olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2). Örneklerin bir tanesinde ZEA miktarı (193 ppb) T.G.K.’ye göre üst limitlerin (100 ppb) üzerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 10). İzmir ilinde yapılan bir çalışmada 89 farklı tahıl ve tahıl bazlı ürünlerde (39 adet mısır ve mısır bazlı ürünler, 40 adet buğday ve buğday bazlı ürünler, 5 adet pirinç, 1 adet arpa ve 4 adet müsli) ZEA analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda toplam 8 örnekte ZEA tespit edilmiştir ve ZEA değerlerinin tümünün T.G.K.’nin belirlediği üst limitlerin (100 µg/kg) altında olduğu saptanmıştır (Bakirci 2014). Türkiye’de yapılan kapsamlı ve güncel bir çalışmada 240 tahıl ve tahıl türevlerinde (50 adet buğday, 15 adet mısır, 15 adet arpa, 20 adet çeltik pirinç, 50 adet buğday unu, 60 adet buğday ekmeği, 10 adet makarna ve 10 adet bisküvi) ZEA analizi HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda buğday, mısır, çeltik pirinç ve buğday unu örneklerinin ZEA kontaminasyonu sırasıyla %4, %20, %55 ve %4 olarak saptanırken, arpa, buğday ekmeği, makarna ve bisküvi örneklerinde ZEA miktarının ölçüm limitlerinin altında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca buğday ve buğday ununda tespit edilen ZEA konsantrasyonlarının Avrupa Komisyonu tarafında belirlenen üst limitlerden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Golge ve Kabak 2020).

İstanbul ilinde yapılan bir çalışmada 112 farklı un örneği (25 tane tam buğday unu, 29 tane beyaz un, 30 tane çavdar unu ve 28 tane kepek unu) toplanarak ZEA miktarları LC-MS/MS cihazı kullanılarak belirlenmiştir. 112 farklı un örneğinin 15 adedinde ZEA miktarları 0,04-3,04 µg/kg arasında olduğu tespit edilmiştir ve tespit edilen limitlerin T.G.K.'ye göre maksimum limitlerin altında olduğu bildirilmiştir (Türkeşsiz ve Bostan 2020). İran'da 15 buğday örneğinde ZEA analizine bakılan bir çalışmada, örneklerin hiçbirinde ZEA miktarı tespit edilememiştir (Mojtaba vd. 2012). Çalışmamızda elde edilen bulgular literatür bilgisi ile benzer şekilde gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulguların aksine literatürde daha yüksek oranda ZEA tespit edilen çalışmalarda bulunmaktadır. Zaied vd. (2012) ZEA analizi için 155 durum buğday örneklerini analiz etmiş ve ZEA miktarlarının 0 ile 560 µg/kg arasında olduğunu saptamıştır. Kontamine olan örneklerde ortalama ZEA miktarı 110 µg/kg olarak belirlenmiştir. Toplam buğday örneklerinin %23'ünün Avrupa Birliği tarafından tavsiye edilen tolere edilebilir maksimum sınırı (100 µg/kg) aştığı bildirilmiştir (Zaied vd. 2012). Buğdaydan elde edilen 147 farklı örnekte (25 adet spagetti, 34 adet erişte, 29 adet makarna, 37 adet lazanya ve 22 adet bucatini) ZEA analizlerine bakılan çalışma Pakistan'da yapılmıştır. Örneklerin ortalama ZEA içerikleri sırasıyla, spagetti için 7,36 µg/kg, erişte için 6,80 µg/kg, makarna için 4,98 µg/kg, lazanya için 6,90 µg/kg ve bucatini için 8,89 µg/kg olarak bulunmuştur. Çalışma sonunda 46 adet örnekte ZEA kontaminasyonu olduğu saptanmıştır ve Avrupa Komisyonu'nun ZEA konsantrasyonu için belirlediği üst limitleri aşan toplamda 30 örnek tespit edilmiştir (Iqbal vd. 2014). Brezilya'da 2009 ve 2010 yıllarında toplam 745 buğday örnekleri toplanarak ZEA analizi yapılan bir çalışmada, 2009 yılındaki ortalama ZEA konsantrasyonu 142 µg/kg ve 2010 yılındaki ise ortalama 22 µg/kg olarak bulunmuştur. Analiz edilen örneklerde ZEA konsantrasyonu 100 µg/kg'ın üzerinde çıkan 2009 ve 2010 yılları arasında toplam 206 örnek olduğu tespit edilmiştir (Calori-Domingues vd. 2016).

5.1.4. Ekmeklik Buğdayların Rutubet Miktarı ve Su Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Rutubet analizi yapılan ekmeklik buğday örneklerinde rutubet miktarı %10,65 ile %15,23 arasında değişmektedir. Ortalama rutubet miktarı %11,09 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Eskişehir’de yapılan çalışmada bazı ekmeklik buğday örneklerinin rutubet içeriği %13,3 ile %13,6 arasında olduğu bildirilmiştir (Semiz 2021). Benzer şekilde ekmeklik buğday örneklerinde rutubet analizi yapan bir çalışmada rutubet miktarı %9,5 ile %11,8 arasında olduğu belirtilmiştir (Kahrıman ve Egesel 2011). Farklı bir çalışmada ise ekmeklik buğday örneklerinin rutubet miktarı %11,7-12,4 arasında olduğu bildirilmiştir (Tayyar 2005). Çalışmamızda elde edilen bulguların literatür bilgileri ile benzer şekilde olduğu görülmüştür.

Küf ve mikotoksinlerin oluşumunda nem, su aktivitesi ve sıcaklık önemli parametrelerdir (Iqbal, 2021). Nem içeriğinin %14,5 altında tutulması küf ve Mikotoksinlerin önlenmesi için önemlidir (Magan vd. 2010). Ülkemizde de 2013/9 Tebliğ No’lu Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği ile buğday unları için maksimum nem limiti %14,5 olarak belirtilmiştir (Anonim 2013). Analizi yapılan buğday örneklerinde T.G.K.’nin belirlediği maksimum düzeyin (%14,5) üzerinde bir örnek bulunmuştur (%15,234). Nem içeriğinin %14,5 in üzerinde olduğu buğday örneğinin (5. örnek) mikotoksin analizleri sonucu, AFB1 miktarının (2,55 ppb) ve ZEA miktarının (193 ppb) T.G.K.’nin AFB1 (2 µg/kg) ve ZEA (100 µg/kg) için belirlediği üst limitleri aştığı görülmüştür (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3).

Su aktivitesi küf ve mikotoksinlerin oluşumu için önemli olan parametrelerden biridir (Iqbal 2021). Su aktivitesi değerinin 0 ile 1 arasında değiştiği ve bu değer maksimum 0,5-0,6 olduğunda hiçbir mikroorganizmanın gelişemediği belirtilmektedir. Ayrıca minimum su aktivitesinin 0,83-0,87 arasında olmasıyla Aflatoksinlerin ve 0,87-0,90 arasında olmasıyla da Okratoksinlerin oluştuğu bildirilmektedir (Ayhan 2000). Çalışmamızda ekmeklik buğday örneklerinin su aktivitesi analizi sonucunda örneklerdeki su aktivitesinin 0,675 ile 0,696 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Su aktivitesi ortalama 0,685 olarak bulunmuştur. Bu husus araştırma örneklerindeki mikotoksin dağılımları üzerine oldukça etkili olmuş olup, örneklerin

5.2. Sonuç

Bu çalışma polar özellikteki kolonlara dayalı ve resmi onaylı bir HPLC yöntemi kullanılarak; Afyonkarahisar ilindeki bazı ekmeklik buğday tedarik eden (Zahireciler) ve işleyen işletmelerden (un fabrikaları) 2021 – 2022 yılları içinde sağlanmış olan ticari buğday örneklerindeki bazı mikotoksinlerin (Aflatoksin, Okratoksin A ve Zearalenon) mevcut durumunu gıda güvenliği açısından tespit etmek için gerçekleştirilmiştir.

- Analiz edilen 20 adet ekmeklik buğday numunelerinin %50'sinin (10 adet örnek 10/20) Aflatoksinlerle (AFB1 ve Toplam Aflatoksin) kontamine olduğu belirlenmiştir. Buğday örneklerinin %5'sinin (1 adet örnek 1/20) AFB1 miktarının T.G.K.'nin belirlediği yasal sınırın (2 µg/kg) üzerinde olduğu tesbit edilmiştir.
- Ekmeklik buğday örneklerinin %35'inin (7 adet örnek 7/20) Okratoksin A ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Okratoksin analizi yapılan buğday örneklerinin %5'inin (1 adet örnek 1/20) T.G.K.'nin belirlediği yasal sınırın (5 µg/kg) üzerinde olduğu görülmüştür
- Ekmeklik buğday örneklerinde yapılan, Zearalenon (ZAE) analizi sonucunda mevcut örneklerin %40'ının (8 adet örnek 8/20) kontamine olduğu bulunmuştur. Ekmeklik buğday örneklerinin %5'inde ZEA miktarı (193 ppb) T.G.K.'ye göre üst limitlerin (100 ppb) üzerinde olduğu belirlenmiştir
- Analizi yapılan ekmeklik buğdayların ortalama rutubet miktarı %10,65 ile %15,23 arasında değişmekte olup, buğday örnekleri için ortalama değer %11,09 olarak tesbit edilmiştir. T.G.K. Buğday Unu Tebliği'nde belirtilen maksimum nem düzeyini (%14,5) aşan sadece bir örnek tespit edilmiştir. Ekmeklik buğday örneklerinin su aktivitesi ortalama 0,685 olarak belirlenmiştir. Su aktivitesi değeri, özellikle mikotoksin ürettiği bilinen fungusların gelişimi üzerine ipucu veren önemli bir göstergedir.
- Yapılan bu çalışma sonucunda gıda güvenliği ve tahıllara ait hammaddelerin muhafazası açısından mikotoksin kontaminasyonun rutin olarak izlenmesi sonucuna varılmıştır.

- Mikotoksinlerin kontaminasyon riskini en aza indirmek için tahılların üretiminden tüketimine kadar sürekli kontrol ve izleme programının oluşturulmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.
- Hasat, işleme, taşıma ve depolama için optimum tekniklerin kullanılması ve özellikle de hasat için uygun zamanın seçilmesi, gıdalardaki mikotoksin kontaminasyon riskini azaltmada veya ortadan kaldırmada önemli bir aşama olarak görülmelidir. Bu şekilde insan sağlığına yönelik tehdidi önlemek mümkündür.



6. KAYNAKLAR

- Adeyeye S A, 2016, Fungal mycotoxins in foods: A review, *Cogent Food & Agriculture* 2, 1213127.
- Al Anati L, Petzinger E, 2006, Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29, 79-90.
- Algül I, Kara D, 2014, Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey, *Food Chemistry* 157, 70-76.
- Alkadri D, Rubert J, Prodi A, Pisi A, Mañes J, Soler C, 2014, Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria, *Food Chemistry* 157, 111-118.
- Anonim, 2000, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Sim Matbaası, Ankara.
- Anonim, 2008, Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (TEBLİĞ NO: 2008 / 26), Vol. 2022.(2817 sayılı ve 29 /11/ 2011)
- Anonim, 2013, Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği, Tebliğ No: 2013:9 (T. v. H. B. Gıda, ed.), Ankara. 28606 ve 2013/9)
- Anttila A, Bhat R V, Bond J A, Borghoff S J, Bosch F X, Carlson G P vd., 2002, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 82.
- AOAC (2003,02) 2008, Official methods of analysis, Association of official analytical chemists. 18th edition, Washington D C.
- Armorini S, Altafini A, Zaghini A, Roncada P, 2015, Occurrence of aflatoxin B1 in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling, *Food Control* 50, 858-863.
- Ashiq S, 2015, Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 159-175.

- Aydin A, Gunsen U, Demirel, S T, 2008, Total aflatoxin, aflatoxin B1 and ochratoxin A levels in Turkish wheat flour, Journal of Food and Drug Analysis 16.
- Aydin A, Günşen U, Demirel S, 2008, Total aflatoxin, aflatoxin B (1) and ochratoxin a levels in Turkish wheat flour, Journal of Food and Drug Analysis, 48-53.
- Aydoğdu H, 2016, Edirne İlinde Hasat Sonrası Depolanmış Buğdaylar Üzerinde Taşınan Mikrofungusların İzolasyon ve İdentifikasyonu, Akademik Gıda 4, 362-367.
- Ayhan K, 2000, Gıdalarda mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası 522.
- Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2021, Tarım Ürünleri Piyasaları BUĞDAY. (Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. Enstitüsü, ed.), Ankara.
- Bakirci Türközü G, 2014, Tahıl ve tahıl ürünlerinin Aflatoksin, Okratoksin a, Zearalenon, fumonisin ve deoksinivalenol mikotoksinleri yönünden incelenmesi, Akademik Gıda 12, 46-56.
- Bbosa G S, Kitya D, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo W W, Kyegombe D B, 2013, Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems, Aflatoxins-recent advances and future prospects 12, 239-265.
- Bennett J W, Inamdar A A, 2015, Are some fungal volatile organic compounds (VOCs) mycotoxins? Toxins 7, 3785-3804.
- Birck N, Lorini I, Scussel V, 2006, Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest, In "9th international working conference on stored product protection", pp. 198-205.
- Büyüker S M, 2018, Ekmek ve Bazı Tahıl Ürünlerinde Okratoksin A Bulunurluğu ve Toksik Etkileri, Akademik Gıda 17, 300-305.
- Büyükunal S K, Vural A, 2007, Aflatoxin B1, Total Aflatoxin and Ochratoxin A Levels in Wheat Flour, Asian Journal of Chemistry 19, 4075.
- Calori-Domingues M A, Bernardi C M G, Nardin M S, de Souza G V, Dos Santos F G R, Stein M d. A, vd., 2016, Co-occurrence and distribution of deoxynivalenol,

nivalenol and Zearalenone in wheat from Brazil, Food Additives & Contaminants: Part B 9, 142-151.

Cengiz M, Oruç H H, Uzunoğlu İ, Sonal S, 2007, Ochratoxin A levels in different types of bread and flour (farklı tip ekmek ve unlarda okaratoksin A düzeyleri), Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 26, 7-10.

D'Mello J F, 1997, "Handbook of plant and fungal toxicants," CRC press.

Daou R, Joubrane K, Khabbaz L R, Maroun R G, Ismail A, El Khoury A, 2021, Aflatoxin B1 and ochratoxin A in imported and Lebanese wheat and-products, Food Additives & Contaminants: Part B 14, 227-235.

Demirel R, Sariozlu N Y, 2014, Mycotoxigenic moulds and mycotoxins in flours consumed in Turkey, Journal of the Science of Food and Agriculture 94, 1577-1584.

Do T H, Tran S C, Le C D, Nguyen H-B T, Le P-T T, Le T D, vd., 2020, Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and Zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam, Food Control 112, 107- 108.

E.C., 2006, European Commission. Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Communities L364: 5-24.

EFSA, 2011, Panel on Contaminants in the Food Chain, Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of Zearalenone in food, EFSA Journal 9, 2197.

EFSA, 2004, Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed, EFSA Journal 2, 73.

Ertugay M F 2006, Ambalajlama İşleminin Ekmeğin Su Aktivitesi Üzerine Etkisi, Gıda
31

- Eskola M, Kos G, Elliott C T, Hajšlová J, Mayar S, Krska R, 2020, Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, 2773-2789.
- Fink Gremmels J, Jahn A, Blom M J, 1995, Toxicity and metabolism of ochratoxin A, *Natural Toxins* 3, 214-220.
- Giray B, Girgin G, Engin A B, Aydın S, Sahin G, 2007, Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey, *Food Control* 18, 23-29.
- Girgin G, Başaran N, Şahin G, 2001a, Dünyada Ve Türkiye de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 58, 97-118.
- Golge O, Kabak B, 2016, First report: Exposure estimates to ochratoxin A through wheat bread and rice intake in Turkey, *Journal of Cereal Science* 69, 213-217.
- Golge O, Kabak B, 2020, Occurrence of deoxynivalenol and Zearalenone in cereals and cereal products from Turkey, *Food Control* 110, 106982.
- Güher Y, 2008, Tekirdağ ve Çorum İllerinde Üretilen Buğday ve Çavdar Unlarında Aflatoksin Miktarlarının Belirlenmesi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 39s, Tekirdağ.
- Hathout A S, Abel-Fattah S M, Abou-Sree Y H, Fouzy A S, 2020, Incidence and exposure assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Egyptian wheat, *Toxicology reports* 7, 867-873.
- Hepsağ F, 2020, Buğday ve çeltikte Okratoksin A'nın kantitatif olarak tespiti ve validasyon çalışması, *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi* 6, 336-346.
- Hussein H S, Brasel J M, 2001, Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology* 167, 101-134.
- Iqbal S Z, 2021, Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review, *Current Opinion in Food Science* 42, 237-247.
- Iqbal S Z, Asi M R, Jinap S, Rashid U, 2014, Detection of aflatoxins and Zearalenone contamination in wheat derived products, *Food Control* 35, 223-226.

- JECFA, 2000, Safety evaluation of certain food additives and contaminants - report of joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 82.
- JECFA, 2007, Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Sixty-eighth report of the joint FAO/WHO Expert committee on food Additives.
- Jelinek C F, Pohland A E, Wood G E, 1989, Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an update, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72, 223-230.
- Ji F, Xu J, Liu X, Yin X, Shi J, 2014, Natural occurrence of deoxynivalenol and Zearalenone in wheat from Jiangsu province, China, *Food Chemistry* 157, 393-397.
- Joint F, 2001, "Safety evaluation of certain mycotoxins in food," FAO, IPCS, 712p, Geneva.
- Joshaghani H, Namjoo M, Rostami M, Kohsar F, Niknejad F, 2013, Mycoflora of fungal contamination in wheat storage (silos) in Golestan Province, North of Iran, *Jundishapur journal of Microbiology* 6 (4), Article number e6334
- Juan C, Pena A, Lino C, Moltó J, Mañes J, 2008, Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal, *International Journal of Food Microbiology* 127, 284-289.
- Kahrıman F, Egesel C Ö, 2011, Farklı Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Agronomik ve Kalite Özellikleri Bakımından Değerlendirilmesi, *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 1, 22-35.
- Kara G N, Ozbey F, Kabak B, (2015). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey, *Food Control* 54, 275-281.
- Karagözlü N, Karapınar M, 2000, Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin-A ve Fungal Kontaminasyon, *Turkish Journal of Biology Turk J Biol* (24, 561-572).
- Keskin Ş, Özkaya H, 2013, Tahılların Depolanması Sırasında Böcek Üremesi ve Etkileri, *Akademik Gıda* 11, 101-105.
- Koç N F, 2016, Adana' da Fırın ve marketlerde Satışa Sunulan Ekmeklerde Okratoksin A (OTA) varlığının HPLC Yöntemi İle Araştırılması, *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 34s, Adana.

- Magan N, Aldred D, Mylona K, Lambert R J, 2010, Limiting mycotoxins in stored wheat, *Food Additives and Contaminants* 27, 644-650.
- Magan N, Medina A, Aldred D, 2011, Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest, *Plant Pathology* 60, 150-163.
- Mannaa M, Kim K D, 2017, Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage, *Mycobiology* 45, 240-254.
- Minervini F, Dell'Aquila M E, 2008, Zearalenone and reproductive function in farm animals, *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2570-2584.
- Mojtaba R, Mohammad A A, Hamid R S, Hamed A, Ebrahim R, 2012, Determination of Zearalenone contamination in wheat and rice in Chaharmahal va Bakhtyari, Iran, *Journal of Cell and Animal Biology* 6, 54-56.
- Møller C O A, Freire L, Rosim R E, Margalho L P, Balthazar C F, Franco L T, vd., 2021, Effect of lactic acid bacteria strains on the growth and aflatoxin production potential of *Aspergillus parasiticus*, and their ability to bind aflatoxin B1, ochratoxin A, and Zearalenone in vitro, *Frontiers in Microbiology* 12, 1-18.
- Mostafa A, Kazem S, Mohammad S, Rokouei M, 2011, Determination of wheat grain mycoflora in store-pits Golestan Province, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5, 1070-1076.
- Muthomi J W, Ndung'u J K, Gathumbi J K, Mutitu E W, Wagacha J M, 2008, The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat, *Crop Protection* 27, 1215-1219.
- Nathanail A V, Syvähuoko J, Malachová A, Jestoi M, Varga E, Michlmayr H, vd., 2015, Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, Zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 4745-4755.
- Negash D, 2018, A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety, *Journal of Applied Microbiological Research* 1, 35-43.

- Oviedo M S, Ramirez M L, Barros G G, Chulze S N, 2011, Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans, *International Journal of Food Microbiology* 149, 127-132.
- Özay G, Pala M, Saygı B, 1993, Bazı gıdaların su aktivitesi yönünden incelenmesi, *Gıda* 18
- Özberk F, Karagöz A, Özberk İ, Atlı A, 2016, Buğday Genetik Kaynaklarından Yerel ve Kültür Çeşitlerine; Türkiye'de Buğday ve Ekmek, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi 25, 218-233.
- Özkaya Ş, Temiz A, 2003, Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 1, 1-21.
- Özturan K, Ünsal C, Karakaya Y, Atasever M, Ceylan Z, Atasever Aydemir M, Demirkaya A K, 2007, Erzurum'da Tüketime Sunulan Buğday Unlarının Toplam Aflatoksintoksin, Aflatoksin B1 ve Okratoksin A Yönünden İncelenmesi, *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg* 2, 172-176.
- Patterson D, 1983, Aflatoxicosis in farm animals. *Veterinary Research Communications* 7, 135-140.
- Pose G, Patriarca A, Kyanko V, Pardo A, Fernández Pinto V, 2010, Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium, *International Journal of Food Microbiology* 142, 348-353.
- Puntarić D, Bošnjir J, Šmit Z, Škes I, Baklaić Z, 2001, Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy, *Croat. Med. J* 42, 175-180.
- Reddy K, Salleh B, Saad B, Abbas H, Abel C, Shier W, 2010, An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health, *Toxin Reviews* 29, 3-26.
- R-Biopharm, 2021 a. Ochratoxin A Test, Rhone-diagnostics Technologies Ltd. West of Scotland Science Park, Glasgow Scotland G20 0SP, UK.
- R-Biopharm, 2021 b. Zearalenone Test, Rhone-diagnostics Technologies Ltd. West of Scotland Science Park, Glasgow Scotland G20 0SP, UK.

- Sabuncuoğlu S A, Baydar T, Giray B, Şahin G, 2008, Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28 (1), 63-92.
- Sağlam A, Masatcıoğlu M T, 2021, RASFF sisteminde tahıl ve fırıncılık ürünlerinin Aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri ve Hatay yöresi buğdaylarının bu mikotoksinler açısından değerlendirilmesi, Gıda 46, 1195-1204.
- Semiz M, 2021, Eskişehir koşullarında bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinin verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 38s, Eskişehir.
- Seviktürk İ M, Gönülalan Z, 2007, Kayseri’de Tüketime Sunulan Bazı Tahıl Ürünlerinde Okratoksin A Miktarları, Sağlık Bilimleri Dergisi 16, 86-90.
- Shephard G S, 2008, Determination of mycotoxins in human foods, Chemical Society Reviews 37, 2468-2477.
- Stanciu O, Juan C, Miere D, Loghin F, Mañes J, 2017, Occurrence and co-occurrence of Fusarium mycotoxins in wheat grains and wheat flour from Romania, Food Control 73, 147-155.
- Steyn P, Stander M, 1999, Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins and fumonisins, General and Applied Toxicology. 2nd Edition, United Kingdom: Macmillan Reference Ltd, 2145-76.
- Stroka J, von Holst C, Anklam E, Reutter M, 2003, Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B1 in cattle feed: collaborative study, Journal of AOAC International 86, 1179-1186.
- Sumıahadı A, Mülâyim M, Acar R, 2020, Tahılların Depolanmasında Genel Prensipler ve Çeltiğin Depolanması, Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi 9, 102-112.
- Taheri N, Semnani S, Roshandel G, Namjoo M, Keshavarzian H, Chogan A, vd., 2012, Aflatoxin contamination in wheat flour samples from Golestan Province, Northeast of Iran, Iranian Journal of Public Health 41(9), 42-47
- Tayfur M, 2009, Gıda Kaynaklı Enfeksiyonlar ve Zehirlenmeler, Gıda Hijyeni 311-314.

- Tayyar Ş, 2005, Biga koşullarında yetiştirilen farklı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının verim ve bazı kalite özelliklerinin saptanması, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 18, 405-409.
- Tima H, Brückner A, Mohácsi-Farkas C, Kiskó G, 2016, Fusarium mycotoxins in cereals harvested from Hungarian fields, Food Additives & Contaminants: Part B 9, 127-131.
- Tiryaki O, Seçer E, Temur C, 2011, Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri, ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi 1, 44-58.
- Waldemar M. Dabrowski and Zdzislaw E. Sikorski, (Eds). 2004..Toxins in food. – (Chemical and functional properties of food series) ISBN 0-8493-1904-8 (alk. paper) RA1258.T727 2004 Chapter 9
- Trucksess M W, Giler J, Young K, White K D, Page S W, 1999, Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee—1997, Journal of Analytical AOAC International 82, 85-89. TUIK, 2022, Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2022.
- Tunail N, 2000, Funguslar ve mikotoksinler, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2, 1-50.
- TÜİK, 2021, Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2021. Vol. 2022, Ankara.
- Türkeşsiz K, Bostan K, 2020, İstanbul'daki Tahıl Unlarında Aflatoksin, Deoksinivalenol ve Zearalenon Düzeyleri Tr. Doğa ve Fen Derg. 1, 131-136. (Association of Official Analytical Chemists)
- Türkeşsiz K, Bostan K, 2020, İstanbul'daki Tahıl Unlarında Aflatoksin, Deoksinivalenol ve Zearalenon Düzeyleri, Türk Doğa ve Fen Dergisi 9, 131-136.
- Viswanath P, Kavitha S, Ayesha F, Appaiah K, 2007, A survey of ochratoxin a in wheat and barley in India, Journal of Food Safety 27, 111-123.

WHO, 1993, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans No 56, International Agency for Research on Cancer, Bookshelf ID: NBK513594, UK

Yentür G, Er B, 2011, Gıdalarda Aflatoksin varlığının değerlendirilmesi, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 69, 41-52.

Zaied C, Zouaoui N, Bacha H, Abid S, 2012, Natural occurrence of Zearalenone in Tunisian wheat grains, Food Control 25, 773-777.

Zebiri S, Mokrane S, Verheecke-Vaessen C Choque E, Rehioui H, Sabaou N, Vd., 2018 Occurrence of ochratoxin A in Algerian wheat and its milling derivatives, Toxin Reviews 37, 1-6.

Zinedine A, Juan C, Idrissi L, Mañes J, 2007, Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco, Microchemical Journal 87, 154-158.

İnternet Kaynakları

1- https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2022_0_P14_OCHRAPREP_Safety-Data-Sheet-V3_EN_LowRes.pdf, 01.10.2022

2-https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2022-10_RP91_EASI-EXTRACT_ZEARALENONE_Safety-Data-Sheet-V3_EN_LowRes.pdf, 01.10.2022